

UNIVERSITE DE NANCY I
U.E.R. Physique, Chimie,
Biologie

THÈSE

présentée à l'Université de Nancy I
en vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR-INGÉNIEUR

par

Memduh KARAKUS

INGENIEUR AGRONOME
de l'Université d'Ankara

ETUDE BIOCHIMIQUE & TECHNOLOGIQUE DES REACTIONS DE BRUNISSEMENT AU MALTAGE

Soutenue le 12 Novembre 1975
devant la Commission d'Examen

C.N.R.S. n° AO 11 725

MM. R. GAY	Président
R. SCRIBAN	Rapporteur
L. CHAPON	Examineur
M. METCHE	Examineur
R. BOUVARD	Membre invité



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555024_0016

UNIVERSITE DE NANCY I
U.E.R. Physique, Chimie,
Biologie

THÈSE

présentée à l'Université de Nancy I
en vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR-INGÉNIEUR

par

Memduh KARAKUS

INGENIEUR AGRONOME
de l'Université d'Ankara

**ETUDE BIOCHIMIQUE & TECHNOLOGIQUE
DES REACTIONS DE BRUNISSEMENT
AU MALTAGE**

Soutenue le 12 Novembre 1975
devant la Commission d'Examen

C.N.R.S. n° AO 11 725

MM. R. GAY	Président
R. SCRIBAN	Rapporteur
L. CHAPON	Examineur
M. METCHE	Examineur
R. BOUVARD	Membre invité

THÈSE

Présentée à l'Université de Nancy I
en vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR-INGÉNIEUR

par

Monsieur KARAKUS

INGÉNIEUR AGGREGÉ
DE l'Université d'Ankara



ETUDE BIOCHIMIQUE ET TECHNOLOGIQUE
DES RÉACTIONS DE BRUNISSEMENT
AU MALTAGE

Soutenue le 13 novembre 1973
devant la Commission d'Examen

Président	MR. J. CAL
Rapporteur	A. KORTA
Examinateur	J. DUBOIS
Examinateur	M. W. TON
Membre suppléant	A. KORTA

UNIVERSITE DE NANCY I
F.E.S. Physique, Chimie,
Biologie

W.R.S. n° 20 13 132

Le travail de recherche de Monsieur M. KARAKUS, Ingénieur Agronome de l'UNIVERSITE d'ANKARA, a été réalisé dans les Laboratoires de la Chaire de Malterie-Brasserie de l'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES INDUSTRIES AGRICOLES ET ALIMENTAIRES, Centre de Douai (F 59509) - Responsable : Monsieur R. SCRIBAN.

Il a pu être entrepris grâce à l'aide financière de la CHAMBRE SYNDICALE DE LA MALTERIE FRANCAISE à Paris.

Nous remercions spécialement son Président - Monsieur R. BOUVARD - et son Secrétaire Général - Monsieur P. FALCIMAIGNE - de leur compréhension des relations Université/Industrie.

Nous témoignons toute notre gratitude aux responsables de la DIRECTION GENERALE DES MONOPOLES D'ETAT de la République Turque qui a attribué une bourse d'études à Monsieur M. KARAKUS pour la réalisation de cette thèse.

AVANT - PROPOS

Au terme de ce travail, il nous est particulièrement agréable de trouver ici, une occasion d'exprimer notre profonde gratitude à Monsieur René SCRIBAN, Maître de Conférences, Directeur de la Chaire de Malterie-Brasserie à l'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES INDUSTRIES AGRICOLES ET ALIMENTAIRES (Massy - Douai). Nous ne saurions lui exprimer assez notre reconnaissance pour avoir grandement facilité notre tâche, non seulement en nous prodiguant ses conseils et encouragements, mais encore pour avoir d'une manière si délicate, grâce à son expérience et son remarquable esprit d'organisation, aplani des difficultés qui se dressaient devant nous, au cours de notre travail.

Nous adressons nos plus vifs remerciements à Monsieur Robert GAY, Professeur de Chimie Biologique à l'UNIVERSITE DE NANCY I, ancien Directeur de l'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DE MALTERIE-BRASSERIE ET DE BIOCHIMIE APPLIQUEE, qui a bien voulu superviser l'ensemble de notre travail et accepter la Présidence de notre jury, en reconnaissance de sa bienveillante attention et de son intérêt porté à notre recherche.

Nous remercions vivement Monsieur Maurice METCHE,
Professeur de Biochimie à l'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'AGRONOMIE
ET DES INDUSTRIES ALIMENTAIRES, pour la compréhension et l'amicale
bienveillance qu'il a manifestées à notre égard. Il a guidé nos
premiers pas vers la recherche scientifique ; qu'il trouve l'expres-
sion de notre profonde et respectueuse gratitude.

A Monsieur Lucien CHAPON, Professeur de Chimie Biologique
à l'UNIVERSITE DE NANCY I, en reconnaissance des précieux conseils
qu'il nous a prodigués et de l'honneur qu'il nous a fait d'accepter
de juger notre travail.

Nous tenons à remercier Monsieur Robert BOUVARD,
Président de la CHAMBRE SYNDICALE DE LA MALTERIE FRANCAISE, qui nous
a fait l'honneur de représenter les Industriels dont l'appui nous
a été indispensable pour la réalisation de ce travail.

A Monsieur André BONASTRE, Directeur de l'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES INDUSTRIES AGRICOLES ET ALIMENTAIRES (Massy - Douai), en remerciement de nous avoir accepté dans le Laboratoire de Recherche au sein de la Chaire de Malterie-Brasserie du Centre de Douai.

Notre gratitude ira tout particulièrement à notre ami Jean-Paul HEBERT, Maître Assistant de la Chaire de Malterie-Brasserie de l'E.N.S.I.A. Nous lui devons de précieux conseils, un accueil chaleureux et un soutien moral tout au long de la réalisation de ce travail ; qu'il trouve ici le témoignage de toute notre amitié.

Nous exprimons notre reconnaissance à Monsieur Max BENARD, Chef de Laboratoire de Contrôle de la Chaire de Malterie-Brasserie à l'E.N.S.I.A. pour les conseils techniques et les facilités de travail qu'il nous a constamment apportés pendant notre recherche.

Nos remerciements vont à Monsieur L. PETIT, Directeur de Recherches à l'INRA (Cerdia, Massy) pour les précieux conseils dans la discussion de nos problèmes.

Que Mademoiselle Annie THERETZ, pour sa précieuse collaboration technique, Mademoiselle Bernadette STROBBEL pour son dévouement, et Monsieur Gérard DEVILLERS pour l'aide indispensable qu'il nous a généreusement apportée lors de la détermination des acides aminés, trouvent ici l'expression de nos sincères remerciements.

Que Mademoiselle Fabienne KSON et le Secrétariat de la Chaire de Malterie-Brasserie qui ont réalisé l'impression de ce mémoire avec leur compétence et minutie habituelles, soient assurés de toute notre reconnaissance.

Qu'il nous soit permis de remercier toutes celles et tous ceux de l'E.N.S.I.A. du Centre de Douai et tout particulièrement de la CHAIRE DE MALTERIE-BRASSERIE, qui, à titres divers, ont contribué à l'achèvement de ce travail.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

I

GENERALITES

1

1. REACTIONS DE BRUNISSEMENT NON-ENZYMATIQUE

1.1. REACTIONS DE MAILLARD

2

1.1.1. Définition

2

1.1.2. Les mécanismes des réactions de Maillard

3

1.1.3. Action de différents facteurs sur le déroulement des réactions

9

3.1. Influence de la température

9

3.2. Influence du pH

11

3.3. Influence de l'humidité

13

3.4. Facteurs divers

14

1.1.4. Réactivité des composants

18

4.1. Réactivité des sucres

19

4.2. Réactivité des sucres aminés

20

4.3. Réactivité des peptides et des protéines

23

1.1.5. Inhibition des réactions de Maillard

27

5.1. Inhibition par le SO₂

28

5.2. Inhibition par les thiols

28 b

5.3. Inhibition par d'autres substances

29

1.1.6. Réactions de Maillard dans l'industrie brassicole

29

6.1. Réactions de Maillard en malterie

30

6.2. Réactions de Maillard en brasserie

38

6.3. Répercussions technologiques des réactions de Maillard en Malterie-Brasserie

41

1.2. <u>REACTIONS DE CAMELISATION</u>	61
1.2.1. Définition	61
1.2.2. Réactions de caramélisation en présence d'acides	62
1.2.3. Réactions de caramélisation en présence d'alcalis	64
1.2.4. Réactions de caramélisation en Malterie-Brasserie	65

2. REACTIONS DE BRUNISSEMENT ENZYMATIQUE

2.1. <u>INTRODUCTION</u>	66
2.2. <u>SYSTEMES ENZYMATIQUES MIS EN JEU</u>	66
2.3. <u>MECANISME REACTIONNEL</u>	74
2.4. <u>INHIBITION DES REACTIONS DE BRUNISSEMENT ENZYMATIQUE</u>	80
2.4.1. Inhibition par la chaleur	80
2.4.2. Inhibiteurs chimiques	81
2.1. Inhibition par le SO_2	82
2.2. Inhibition par les acides	82
2.3. Inhibition par d'autres produits chimiques	83
2.5. <u>REACTIONS DE BRUNISSEMENT ENZYMATIQUE DES POLYPHENOLS</u>	
<u>EN MALTERIE-BRASSERIE</u>	84

3. CONCLUSIONS

TRAVAUX PERSONNELS

1. TRANSFORMATIONS BIOCHIMIQUES DU MALT VERT EN LIAISON AVEC LES RÉACTIONS DE BRUNISSEMENT AU COUP DE FEU

1.1. <u>TECHNIQUES EXPERIMENTALES</u>	93
1.1.1. Matériel d'étude	93

1.1.2. Touraillage	93
1.1.3. Méthodes analytiques	93
1.2. <u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	100
1.2.1. Evolution de la couleur et de la surcoloration	100
1.2.2. Evolution du pouvoir réducteur et des réductones	104
1.2.3. Evolution des acides aminés et des glucides	106
1.2.4. Evolution de quelques activités enzymatiques	110
1.2.5. Evolution relative des cétose-amines au coup de feu	112
1.3. <u>CONCLUSIONS</u>	113

2. PROBLEMES SOULEVES EN MALTERIE PAR LES CONDITIONS D'ENSILAGE DU MALT FRAIS

2.1. <u>INTRODUCTION</u>	115
2.2. <u>PROTOCOLE EXPERIMENTAL</u>	116
2.3. <u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	117
2.4. <u>CONCLUSION</u>	120

3. ETUDE DES PHENOMENES DE SORPTION DANS LE MALT EN RELATION AVEC LA VARIETE D'ORGE ET SON NIVEAU DE DESAGREGATION

3.1. <u>INTRODUCTION</u>	121
3.2. <u>NOTIONS FONDAMENTALES SUR L'ETAT DE L'EAU DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES ET L'IMPORTANCE DES PHENOMENES DE SORPTION</u>	122

3.3. <u>TECHNIQUES EXPERIMENTALES</u>	128
3.3.1. Méthode de Micromaltage	128
3.3.2. Détermination de la pression de vapeur d'eau du malt	129
3.4. <u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	132
3.5. <u>CONCLUSIONS</u>	137

4. ETUDE SUR L'ISOLEMENT ET L'IDENTIFICATION DES CETOSE-AMINES DU MALT

4.1. <u>INTRODUCTION</u>	138
4.2. <u>TECHNIQUES EXPERIMENTALES ET RESULTATS</u>	143
4.2.1. Préparation de l'extrait de malt	143
4.2.2. Isolement des cétose-amines du malt par chromatographie sur résine échangeuse d'ions	143
2.1. Préparation de la colonne de résine Amberlite CG 120 forme Na ⁺	143
2.2. Conditions d'élution	144
2.3. Etablissement des courbes d'élution	144
4.2.3. Dessalage des fractions isolées	147
4.2.4. Isolement des constituants des différentes fractions de cétose-amines par la chromatographie préparative sur papier	148
4.2.5. Purification et séparation ultérieure des constituants par l'électrophorèse sur papier	149
4.2.6. Essais d'identification des cétose-amines	152
4.3. <u>CONCLUSIONS</u>	154

5. REDUCTEURS DU MALT ET LEURS RELATIONS AVEC D'AUTRES CRITERES ANALYTIQUES

5.1. <u>ORIGINE DES REDUCTEURS DU MALT</u>	156
5.2. <u>METHODES DE DOSAGE DES REDUCTEURS EN BRASSERIE</u>	157
5.3. <u>METHODES ANALYTIQUES</u>	161
5.3.1. Méthode de dosage des réductones	161
1.1. <i>Principe et historique</i>	161
1.2. <i>Réactifs</i>	163
1.3. <i>Mode opératoire</i>	163
1.4. <i>Courbe d'étalonnage et détermination du</i> <i>coefficient de correspondance</i>	164
1.5. <i>Répétabilité de la méthode</i>	165
5.3.2. Détermination du pouvoir réducteur (réducteurs totaux)	166
2.1. <i>Principe et historique de la méthode</i>	166
2.2. <i>Réactifs</i>	168
2.3. <i>Mode opératoire</i>	169
2.4. <i>Courbe d'étalonnage</i>	169
2.5. <i>Répétabilité de la méthode</i>	170
5.4. <u>INFLUENCE DE DIFFERENTS TYPES DE REDUCTEURS DU MALT</u> <u>DANS LES METHODES DE DOSAGE</u>	170
5.5. <u>ETUDE STATISTIQUE SUR LES RELATIONS DES REDUCTEURS</u> <u>AVEC D'AUTRES CRITERES ANALYTIQUES DU MALT</u>	176
5.6. <u>CONCLUSIONS</u>	180

6. REACTIONS DE BRUNISSEMENT NON-ENZYMATIQUE DANS LES MOUTS MODELES AU COURS DU TEST KOLBACH-ZASTROW

6.1. <u>INTRODUCTION</u>	182
6.2. <u>TECHNIQUES EXPERIMENTALES</u>	183
6.2.1. Préparation des mûts modèles	183
6.2.2. Méthodes analytiques	184
6.3. <u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	184
6.4. <u>CONCLUSIONS</u>	187
7. CONCLUSIONS GENERALES	188

BIBLIOGRAPHIE

I N T R O D U C T I O N

Dans le cadre des activités de recherche de la *Chaire de Malterie-Brasserie* à l'E.N.S.I.A., une série d'études a été entreprise sur le thème général du **PROBLEME DE LA COULEUR DU MALT, DU MOUT et DE LA BIERE.**

Ce problème intéresse à la fois le malteur et le brasseur.

En effet, le brasseur recherche de nos jours à fabriquer une bière d'un type bien déterminé, donc caractérisée par une couleur donnée et de qualité constante. Il demande en conséquence au malteur une matière première aux caractéristiques bien définies et régulières, et en particulier, il spécifie une couleur du moût conventionnel ou du moût bouilli (test Kolbach-Zastrow).

Comme nous le verrons, la formation de la couleur du malt est très complexe ; elle intéresse de nombreux constituants de l'orge et met en cause de multiples réactions chimiques et biochimiques qu'on appelle généralement les réactions de brunissement dans la littérature scientifique de l'industrie alimentaire.

Dans le cadre de l'industrie brassicole, ces réactions jouent un rôle déterminant non-seulement sur la formation de la couleur et de l'arôme du malt mais aussi sur sa richesse en réducteurs naturels dont on connaît toute l'importance dans les phénomènes d'oxydation de la bière (stabilité colloïdale) .

Dans le présent mémoire, nous exposerons tout d'abord l'historique des recherches relatives aux différents types de réactions de brunissement dans l'industrie alimentaire en général, puis celles effectuées dans le cadre de l'industrie brassicole en particulier. Ensuite nous exposerons les résultats de nos travaux personnels.

GENERALITES

GENERALITES

Les réactions de brunissement sont fréquemment rencontrées dans de nombreux secteurs de l'industrie alimentaire. Elles influencent de façon déterminante, les caractères organoleptiques et les qualités diététiques des aliments.

Leurs effets dans la plupart des cas, ne sont pas désirables, mais dans certains cas, elles contribuent aux qualités organoleptiques des denrées alimentaires, soit par l'apparition d'une coloration, soit surtout par la création d'arômes caractéristiques.

Les réactions de brunissement peuvent être catalysées par des enzymes ou bien elles peuvent se dérouler d'une manière purement chimique sans catalyse enzymatique.

Dans le premier cas, il s'agit de l'oxydation des substances phénoliques par l'oxygène moléculaire sous l'effet catalytique de la polyphénoloxydase. Alors que dans le deuxième cas, les substances mises en jeu sont soit les sucres seuls (réactions de caramélisation), soit les sucres réducteurs avec les protides (réactions de MAILLARD).

Comme nous le verrons, au touraillage du malt vert, le rôle des réactions de brunissement non-enzymatique sur les diverses qualités du malt est de loin le plus important, compte tenu des conditions physiques présentes.

1. RÉACTIONS DE BRUNISSEMENT NON-ENZYMATIQUE

1.1. REACTIONS DE MAILLARD

1.1.1. Définition

C'est un chercheur français, MAILLARD, qui en 1912, a signalé l'existence des réactions de brunissement de sucres et d'acides aminés. Depuis, l'ensemble des réactions du groupement aminé d'une amine, d'un acide aminé, d'un peptide ou d'une protéine avec les composés carbonylés (aldéhydes, cétones, réductones ou sucres réducteurs) aboutissant à la formation des pigments bruns, s'appelle les réactions de MAILLARD.

Les réactions de MAILLARD qui mettent en jeu les composés carbonylés et les protides sont des réactions non-enzymatiques et non-oxydatives. Ce sont ces caractéristiques qui les différencient des autres réactions de brunissement.

Les manifestations successives les plus apparentes des réactions de MAILLARD sont brunissement, dégagement du gaz carbonique et formation d'un précipité, d'autres changements encore, moins visibles immédiatement, intéressent les caractères physiques, physicochimiques et organoleptiques du milieu.

C'est ainsi que dès le début de la réaction, le pouvoir rotatoire est affecté ; un peu plus tard, on peut constater la formation des produits fluorescents dont l'excitation est effectuée par l'extrémité du spectre bleu et par l'U.V. proche et dont l'émission se produit entre le bleu clair et le vert. A partir d'un certain stade, apparaît une absorption ultra-violette dont l'intensité va en croissant jusqu'à un maximum qui précède une chute concomitante à la formation du précipité de mélanoidines. D'autre part, la destruction des

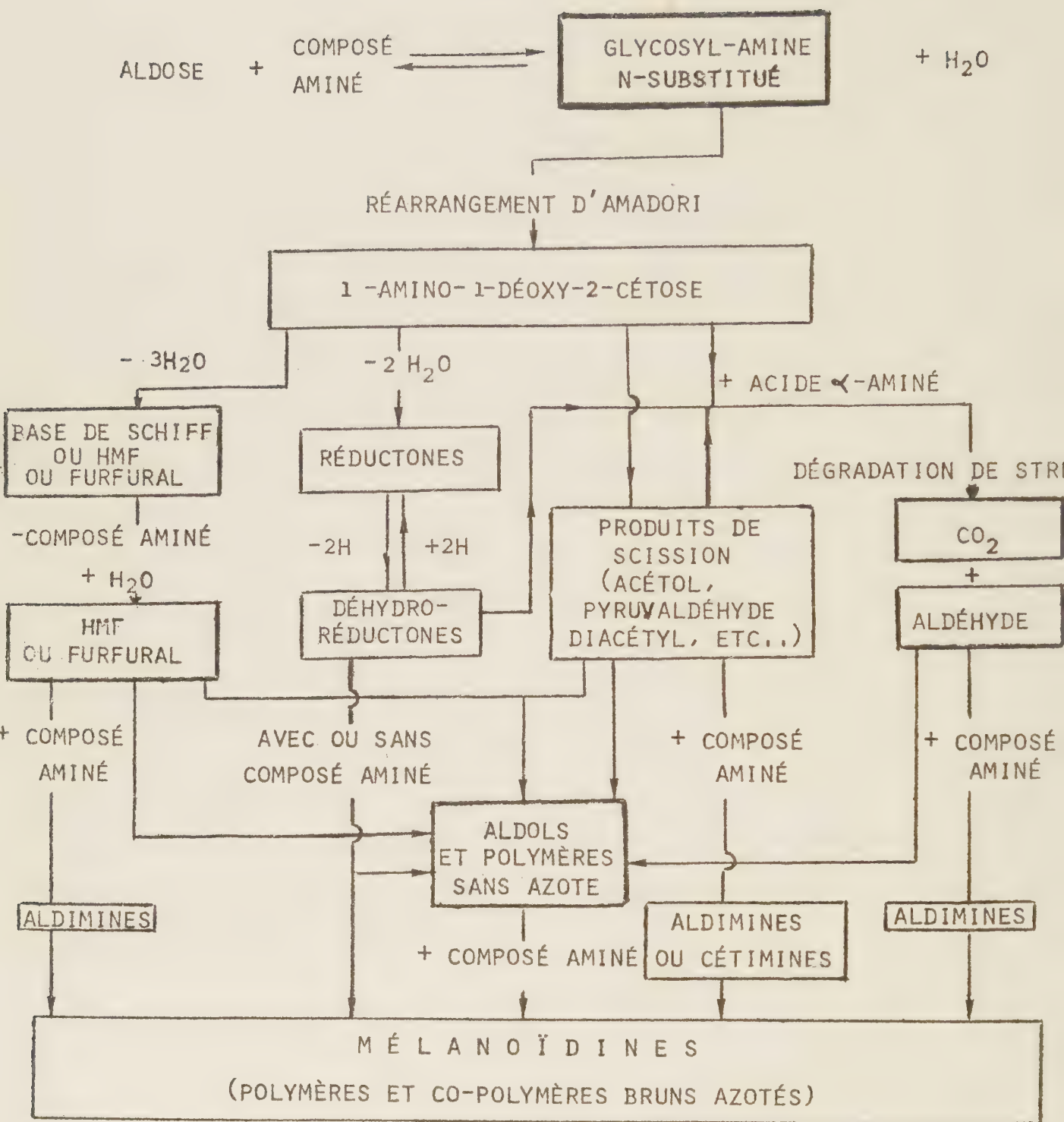


FIGURE 1 Le réarrangement d'Amadori intégré dans les réactions connues conduisant au brunissement des systèmes sucre-amine (D'après HODGE, 1953)

molécules de sucre s'accompagne de la formation des molécules d'un pouvoir réducteur plus élevé, le pH du milieu diminue par le fait de la formation de composés fortement acides. Enfin, du point de vue organoleptique, la réaction provoque la formation de saveurs caractéristiques.

Ce sont les grandes lignes de changements qu'on observe dans un milieu où se produisent les réactions de MAILLARD.

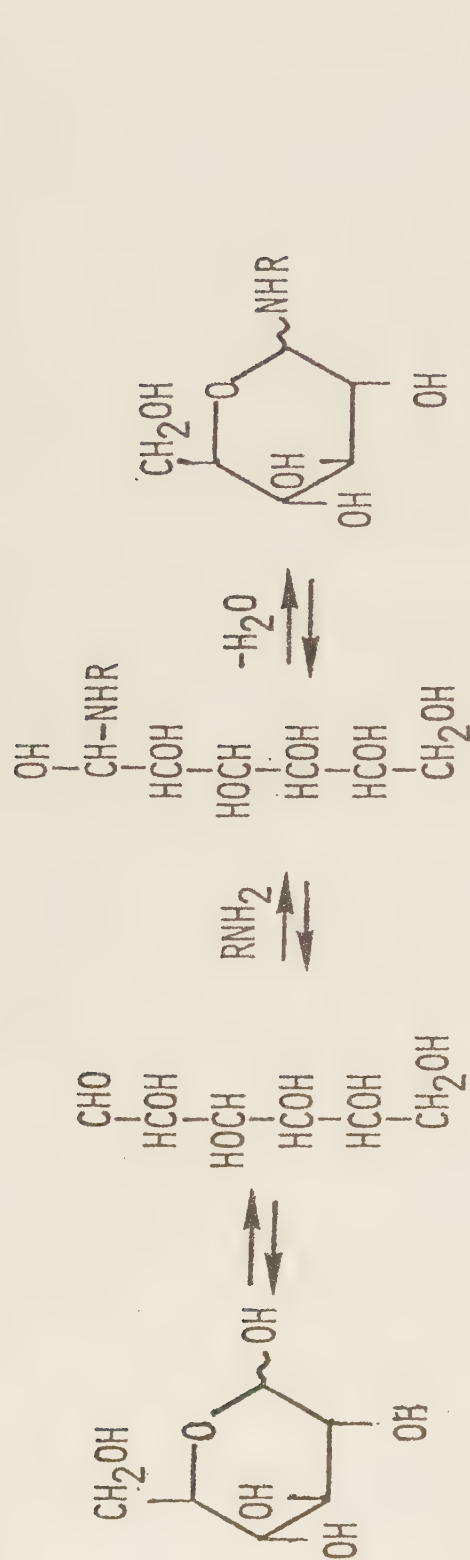
1.1.2. Les mécanismes des réactions de MAILLARD

Malgré un grand nombre de travaux effectués, nos connaissances sur les mécanismes des réactions de MAILLARD sont encore incomplètes. Plusieurs auteurs, afin d'élucider les mécanismes exacts de ces réactions, les ont étudiées dans les systèmes modèles. HODGE (1953) a établi, pour essayer de synthétiser tous les travaux jusqu'à cette date, un schéma qui a marqué une grande étape dans la compréhension de ces réactions. (Fig. 1)

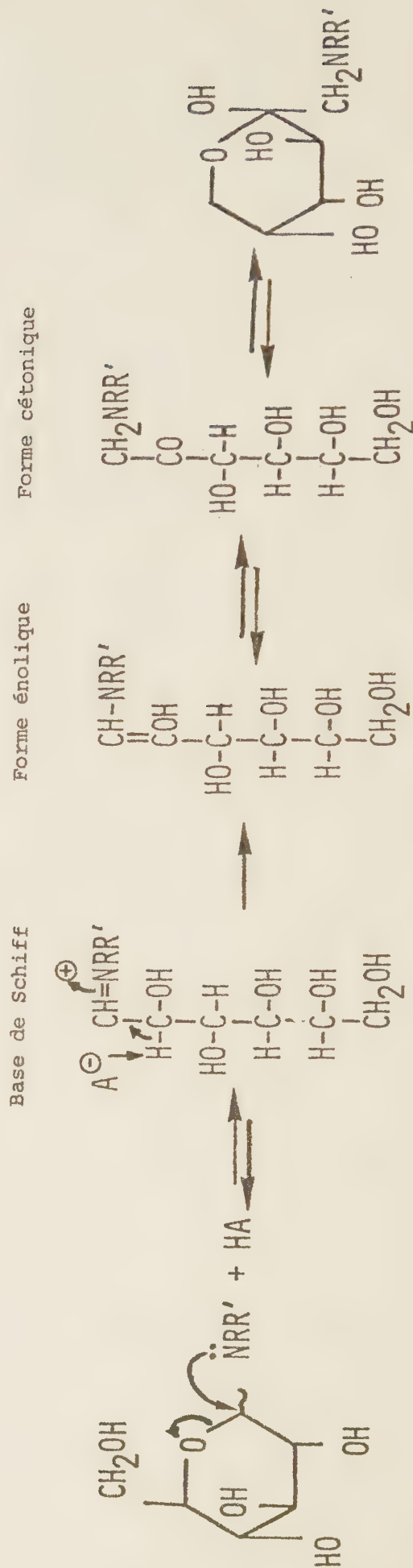
Nous trouvons de nouvelles précisions dans les publications de ELLIS (1959) , REYNOLDS (1963, 1965, 1969) , HODGE (1967) , ESKIN et al. (1971) et HURST (1972) sur la chimie de ces réactions.

Le déroulement des réactions de MAILLARD peut être divisé en cinq étapes (REYNOLDS, 1969) :

- 1° La formation d'un glycosylamine à partir d'un aldose ou d'un céto-
se avec une amine.
- 2° Le réarrangement du glycosylamine à un cétose-amine ou un aldose-
amine.
- 3° La formation d'un dicétose-amine ou d'un sucre diaminé.



- a - Formation des glycosylamines



b - Réarrangement d'Amadori

FIGURE 2 : Etapes initiales des réactions de Maillard

- 4° La dégradation des ose-amines par déshydratation en formant des produits intermédiaires aminés ou non aminés.
- 5° Condensation de l'amine avec les produits formés dans l'étape précédente, suivie par la polymérisation aux pigments bruns.

1° Formation des glucosylamines N-substituées

Le groupement carbonyle d'un sucre réagit avec le groupement aminé d'un protide (Fig. 2a).

La réaction est réversible et l'équilibre pour un composé aminé donné est en fonction du pH et de l'état de l'hydratation du milieu. C'est dans des milieux peu hydratés et de pH légèrement acide que la formation des glycosylamines est fort accélérée (ELLIS et HONEYMAN 1955 , ISBELL et FRUSH 1958). Les aldoses sont généralement plus réactifs que les cétooses dans cette étape des réactions.

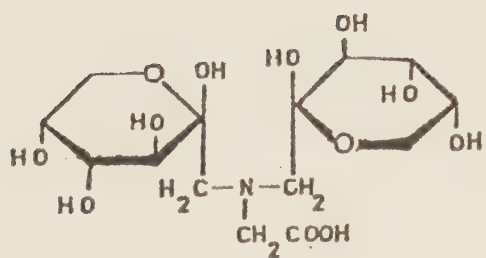
Les glycosylamines sont des substances instables. Ils peuvent être facilement hydrolysés par les acides dilués en donnant les composants initiaux. Ils ne réduisent pas le 2.6-dichlorophenol indophenol.

2° Les réarrangements d'Amadori et de Heyns

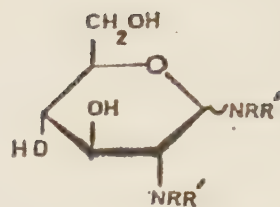
En présence d'un catalyseur acide, les glycosylamines s'isomérisent en 1-amino 1-déoxycétooses (cétoose-amines) ou en 2-amino 2-déoxyaldose (aldose-amine). Dans la réaction d'un ose avec un acide aminé, c'est le groupement carboxylique de l'acide aminé qui joue le rôle de catalyseur.

Le mécanisme de réarrangement d'Amadori présenté dans la figure (2b) a été élucidé par ISBELL et FRUSH (1958). D'après ces auteurs, la cation de base de SCHIFF constitue l'état transitoire dans l'isomérisation d'un aldosylamine à un cétoose-amine.

.../...



(a)



(b)

FIGURE 3 : (a) Difructose-glycine

(b) Aldose-diaminé

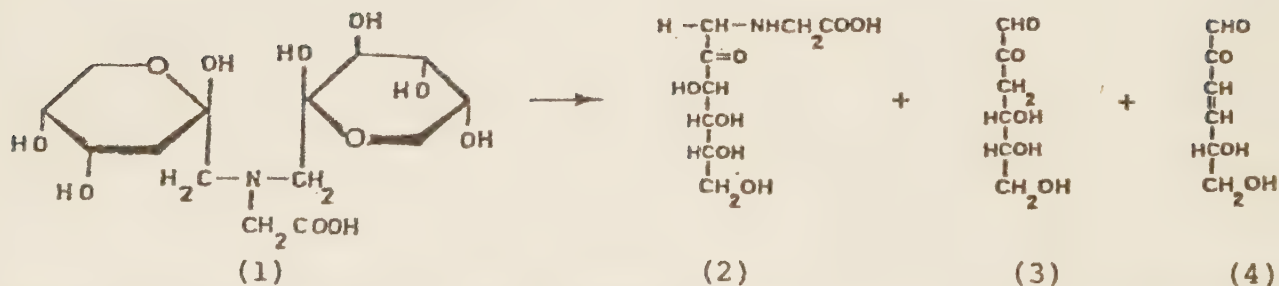


FIGURE 4 : Schéma de la dégradation du difructose-glycine (d'après MC WEENY et al., 1968)

(1) Difructose-glycine

(2) 1-glycino-1-déoxy-2-fructose

(3) 3-Déoxyhexosulose

(4) Hexosulose non saturé

Les cétose-amines sont des composés assez stables aussi bien en milieu solide qu'en solution aqueuse. Par hydrolyse avec des acides dilués, on retrouve le composé aminé initial, mais la partie glucidique se décompose en donnant des furfurals.

Leurs réactivités vis-à-vis des indicateurs rédox sont très caractéristiques. Ils sont moins réactifs que les réductones.

Les propriétés réductrices des aldose-amines (2-amino 2-déoxyaldoses) se ressemblent à celles de glucose c'est-à-dire qu'ils ne réagissent avec les indicateurs rédox qu'à chaud. Ils donnent une réaction positive dans le test d'Elson-Morgan et dans l'hydrolysât obtenu par chauffage avec l'acide acétique dilué, on retrouve les composants initiaux.

3° La formation des dicétose-amines ou des sucres diaminés

Une molécule de cétose-amine peut réagir avec une autre molécule d'aldose. Le produit de condensation ainsi formé par un réarrangement d'Amadori s'isomérisé en dicétose-amine (Fig. 3a). ANET (1959) a isolé le difructose glycine par la réaction d'un fructose glycine avec le glucose.

D'autre part, la formation d'un sucre diaminé par la réaction d'un aldose-amine avec une seconde molécule d'un composé aminé a été démontrée (CARSON, 1955) (Fig. 3b).

4° La dégradation des ose-amines

Dans cette quatrième étape, les ose-amines se dégradent en donnant naissance à des composés aminés ou non aminés et qui sont des intermédiaires très réactifs dans la formation des colorations brunes et des arômes caractéristiques des réactions de MAILLARD. Les réactions qui se déroulent à ce stade sont complexes. Il y a plusieurs

.../...

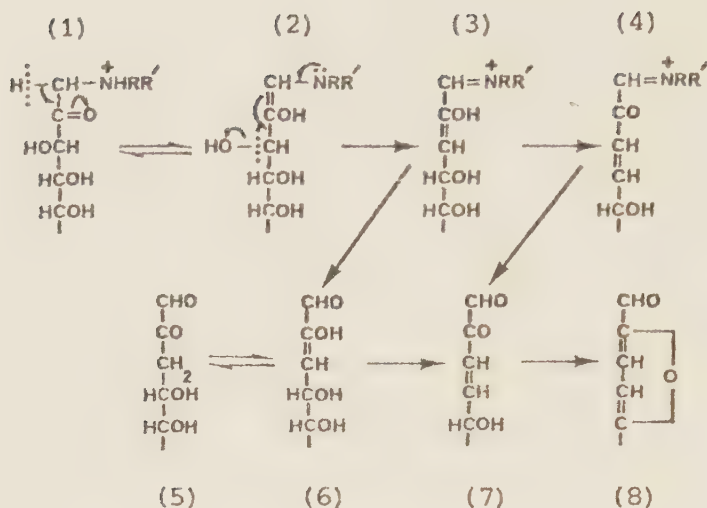


FIGURE 5 : Mécanisme de la dégradation des cétose-amines par la voie de 1.2-énolisation (d'après REYNOLDS, 1969)

- | | |
|------------------------|---------------------------|
| (1) Cétose-amine | (2) 1,2-èneaminol |
| (3) Base de Schiff | (4) Base de Schiff |
| (5) 3-Déoxyosulose | (6) Forme énolique de (5) |
| (7) Osulose non saturé | (8) Furfural |

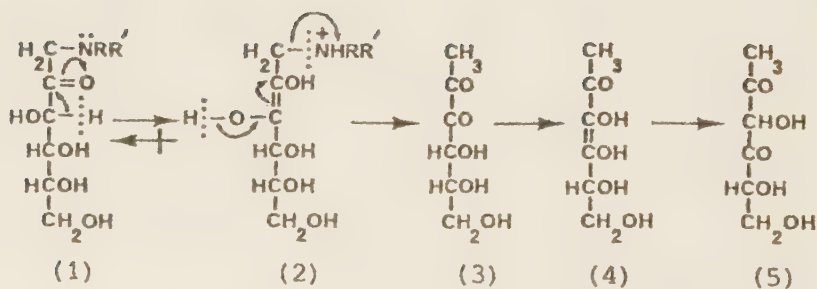


FIGURE 6 : Mécanisme de la dégradation des cétose-amines par la voie de 2,3-énolisation (d'après REYNOLDS, 1969)

- | | |
|------------------------------------|----------------------------------|
| (1) Cétose-amine (forme cétonique) | (2) 2,3-énol |
| (3) 1-déoxy-2,3-diulose | (4) Forme 3,4-ènediolique de (3) |
| (5) 1-déoxy-2,4-diulose | |

voies possibles. L'importance de chacune de ces voies dépend des conditions du système réactionnel.

La décomposition des dicétose-amines en milieu aqueux légèrement acide conduit d'une part à la formation des monocétose-amines et d'autre part à un certain nombre de composés carbonylés, comme les 3-déoxyhexosones et des déoxyhexosones non saturés. (Fig. 4)

Les cétose-amines formés soit par le réarrangement d'Amadori, soit par la décomposition de dicétose-amines se dégradent par une série d'énolisations successives.

La 1-2-énolisation a lieu par une série de réactions présentées dans la figure (5). Les produits formés sont les osuloses insaturés et les déoxyosuloses.

Ces composés qui sont assez stables ont été isolés aussi bien dans des systèmes modèles que dans les produits alimentaires (REYNOLDS , 1963). Ils prennent part dans plusieurs réactions conduisant à la formation des mélanoidines d'une part et des substances aromatiques d'autre part. Ils réagissent avec les composés aminés en donnant naissance à des pyrrole-aldehydes (KATO et FUJIMAKI 1968 et 1970). Par leur déshydratation il se forme des substances du type furfural. D'autre part, étant des composés alpha dicarbonylés, ils peuvent participer à la dégradation des acides aminés par la réaction de Strecker.

La décomposition des cétose-amines par la voie de 2.3-énolisation semble être moins importante que la voie 1.2-énolisation dans la réaction de brunissement d'un aldose avec un composé aminé primaire. Par contre, dans le cas des amines secondaires, les cétose-amines se dégradent principalement par cette voie (HODGE et al. 1963).

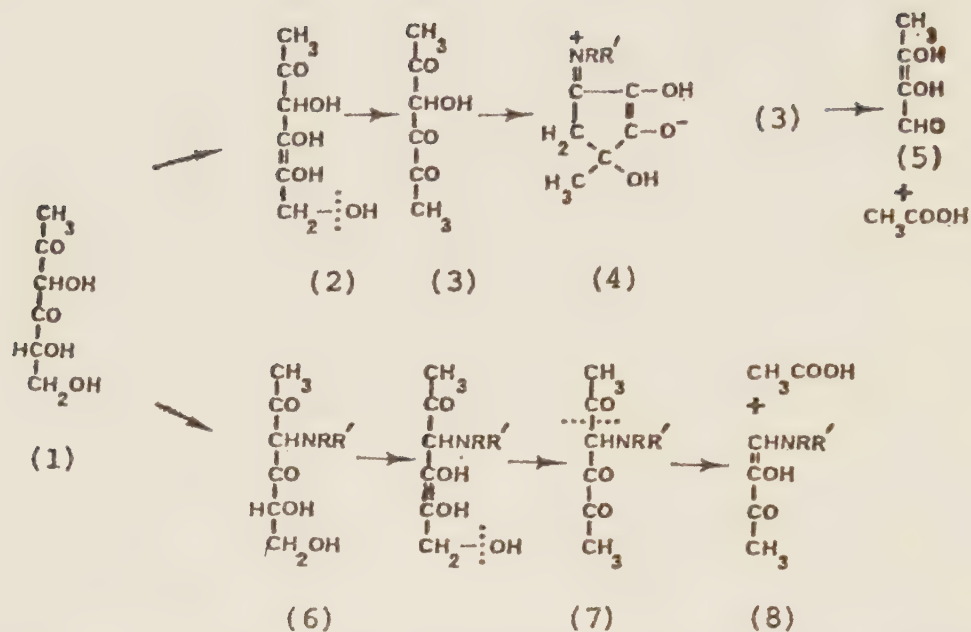


FIGURE 7 : Mécanismes de la formation des réductones et des amino-réductones (d'après HODGE et al., 1963, et SIMON et HEUBACH, 1965)

- | | |
|----------------------------|-------------------------------|
| (1) 1-déoxy-2,4-diulose | (2) Forme 4,5-énolique de (1) |
| (3) Tricétone | (4) Amino-hexose-réductone |
| (5) Réductone à 4 carbones | (6) Amino-dicétone |
| (7) Amino-tricétone | (8) Amino-réductone |



FIGURE 8 : Schéma de la dégradation de Strecker

La 2.3-énolisation est irréversible ce qui n'est pas le cas dans la 1.2-énolisation (Fig. 6). La beta élimination du groupement aminé du 2.3-enediol donne une molécule de 1-déoxy 2.3-diulose. Celui-ci étant un composé très instable, s'isomérisse rapidement en 2.4-diulose.

Les plus importantes réactions des 2.4-diuloses sont la formation des réductones et des amino-réductones, formation des composés hétérocycliques aromatiques du type pyrone, furane, pyrrole etc... et leur participation dans la réaction de Strecker.

Le mécanisme de formation des réductones a été élucidé par SIMON et HEUBACH (1965) (Fig. 7). L'énolisation ultérieure de 2.4-diulose et l'élimination du groupement hydroxylé au niveau de C.6 donne un tricétone.

Le réductone se forme à partir du tricétone par scission sous l'effet catalytique d'un composé aminé. Par ailleurs, une condensation du composé aminé avec le tricétone peut se produire. On obtient alors un aminohexose réductone.

D'autre part, le 2.4-diulose lui-même peut se condenser avec un composé aminé en donnant tout d'abord un amino-cétone puis l'élimination du groupement hydroxylé au niveau de C.6 conduit à la formation d'un amino-tricétone et finalement la scission entre C.2 et C.3 donne une molécule d'acide acétique et une molécule d'amino-réductone.

La formation des composés hétérocycliques a lieu par une déhydratation eu une cyclisation de 2.4-diulose (HODGE et al. 1963, HODGE 1967).

La dégradation de Strecker constitue l'étape spécifique des réactions de MAILLARD. Les composés alpha-dicarbonylés formés au cours de la décomposition des cétose-amines réagissent avec les acides aminés ils les décarboxylent et les transforment en des aldehydes carac-

.../...

téristiques des acides aminés concernés. (Fig. 8).

Les aldehydes ainsi formés sont à la base des arômes caractéristiques des réactions de MAILLARD. La dégradation de Strecker est également à l'origine du dégagement du CO_2 dans les réactions de MAILLARD.

5° La formation d'une coloration brune par un mécanisme encore inconnu constitue la dernière phase des réactions de MAILLARD. On suppose que les produits très réactifs formés dans les étapes précédentes par toute une série de condensation et de polymérisation donnent naissance aux pigments bruns (mélanoïdines).

Aux derniers stades des réactions de Maillard, les mélanoïdines peuvent devenir insolubles.

1.1.3. Action de différents facteurs sur le déroulement des réactions :

Les réactions de Maillard se produisent dans des conditions bien définies. Tout d'abord, l'existence d'un sucre réducteur ou d'un composé carbonylé et d'un composé aminé est indispensable pour que les réactions puissent démarrer. Deuxièmement, les facteurs physiques tels que la température, l'hydratation du milieu, le pH, jouent des rôles prépondérants aussi bien sur la vitesse des réactions que sur la nature des produits intermédiaires et finaux des réactions.

Ainsi, les répercussions des réactions de Maillard dans les industries alimentaires diffèrent selon la nature des composés mis en jeu et selon les conditions sous lesquelles ces réactions se déroulent pendant le processus alimentaire.

Il serait donc opportun d'étudier ces deux groupes de facteurs influençant le déroulement des réactions de Maillard, afin de bien comprendre et de guider les processus alimentaires.

3.1. Influence de la température

On associe couramment dans la littérature concernée, les réactions de Maillard et chauffages. Cependant, la chaleur n'est pas une condition indispensable pour le développement de réactions. Comme il a été mis en évidence par plusieurs auteurs, les réactions de Maillard surviennent aussi bien pendant les périodes de stockage qu'au cours des traitements thermiques. Néanmoins, la vitesse de réactions s'accroît fortement avec une application de la chaleur.

LEA et HANNAN (1949), en étudiant la réaction entre la caséine et le glucose, ont montré qu'une perte d'azote aminé de l'ordre de 0,0015 % peut être décelable dans une période d'une heure à 0°C, ensuite, les auteurs en continuant leurs études à différents degrés de température (allant jusqu'à 90°C) ont conclu que la perte d'acide aminé et la coloration augmentaient progressivement avec la température. Ceci a été confirmé par les travaux de RICHARDS (1956) ; ADRIAN et FAVIER (1961).

L'importance de la température sur le déroulement des réactions de MAILLARD a également été souligné par BIMBENET (1969). Cet auteur dans ses travaux récents, a montré qu'un accroissement de température de 1°C accélère la vitesse des réactions, 13 % environ entre 60 et 100°C.

Selon ADRIAN (1963), l'intensité et la durée du chauffage constituent deux facteurs qui sont interchangeable, en ce sens que l'on obtiendra un effet semblable avec un chauffage très faible, appliqué pendant une longue période ou avec un traitement intense et plus court. Une même perte d'acide aminé peut être enregistrée à la suite de chauffages très différents au laboratoire; un traitement de 25 heures à 120°C ou de 6 heures à 130°C aboutit à une perte identique de lysine (ADRIAN et al. 1961).

Cependant, si l'on envisage d'autres critères que la destruction de l'acide aminé, il paraît exister des réactions de MAILLARD selon le degré de température atteint : les spectres des solutions chauffées ou les arômes formés paraissent déterminés principalement par la température à laquelle on s'est fixé, beaucoup plus que les quantités de chaleur appliquées (PETIT, 1959 ; EL'ODE et al., 1966 ; CHICHESTER et al., 1952 ; HERZ et al., 1960).

3.2. Influence du pH

Le pH joue un rôle capital dans les réactions de MAILLARD. L'intensité de la coloration est faible dans les milieux acides, s'accroît considérablement dans les milieux légèrement alcalins, pour diminuer lorsque l'alcalinité devient plus forte. LEA et HANNAN (1949) en étudiant la réaction entre la caséine et le glucose en état peu hydraté, ont montré qu'entre les limites de pH 3 et pH 10, la coloration augmente avec le pH. Ceci a été confirmé par les travaux de RICHARDS (1956), dans la réaction entre la glycine et le glucose en état peu hydraté.

ADRIAN et al. (1961) d'autre part, signale que la coloration d'une solution de glucose-lysine à 120° C est à son point culminant dans un milieu NaOH 1N et pour des pH plus alcalins, l'intensité de la coloration diminue.

Une étude détaillée sur l'influence de pH et de divers types d'acides aminés (alpha, omega, alpha-oméga) sur l'intensité de brunissement formé par chauffage à 114°C pendant 20 minutes d'une solution de glucose a été effectué par UNDERWOOD et al. (1959), dont voici les principaux points :

- à pH 5 aucun brunissement n'a été observé.
- à pH 6 seulement les acides alpha-omega diaminés ont causé un brunissement appréciable.
- à pH 6,5 les acides omega aminés et alpha-oméga-diaminés ont produit un brunissement.
- à pH 7 tous les acides aminés ont produit un brunissement plus ou moins intense en fonction de la position de leur groupement aminé.

Un prolongement de la période de chauffage cause cependant un brunissement même dans le pH acide. Par exemple, SMIRNOV et GEISPITS (1956) ont observé que le chauffage d'une solution aqueuse de glucose-glycocolle à 100°C pendant 15 heures produisait une coloration pour la valeur de pH 2. Cependant les auteurs ont par la suite montré que cette coloration observée n'est pas due aux réactions de Maillard proprement dites, mais à la dégradation thermique du glucose catalysée par l'acide. Ils ont ensuite conclu que le brunissement attribuable aux réactions de Maillard se produit à partir de pH 4 et il s'intensifie en fonction du pH.

Selon PETIT (1959), en milieu acide, le principal responsable de l'absorption en UV, parmi les précurseurs incolores, est le 5 HMF (5-hydroxy-méthyl-2-furfural). Il semble que dans ces conditions, la réaction de brunissement est due à une réaction du glycocolle avec 5 HMF provenant de la dégradation du glucose et non à la réaction de Maillard proprement dite, entre glucose et glycocolle.

En milieu très alcalin, pH 11 et au-dessus, les aldoses sont susceptibles de s'isomériser en cétooses dont les aptitudes réactionnelles sont différentes.

Les arômes formés par les réactions de Maillard peuvent être influencés par le pH du milieu réactionnel.

En effet, dans une publication récente de EL'ODE et al. (1966), ceci a été mentionné : le nombre de composés volatils carbonyles produits par la réaction entre le glucose et l'acide glutamique à 180°C augmente considérablement avec le pH entre les valeurs de pH 5-8.

En dehors de la coloration de solutions et de formation des mélanoidines, la réaction de Maillard provoque la destruction d'acides aminés, dans laquelle le pH joue un rôle de premier plan, en ce sens

qu'il constitue, tantôt un agent protecteur parfaitement efficace, tantôt au contraire, il accélère considérablement les effets des réactions de MAILLARD (ADRIAN, 1961, 1963, 1965). Cet auteur, dans une série de travaux, a étudié le comportement des acides aminés chauffés en présence de glucose dans des différents milieux de pH, et il a conclu qu'en fonction du pH initial du milieu, le comportement des acides aminés suit une évolution dont on peut distinguer schématiquement trois phases :

- De la neutralité à HCL 6N : la stabilité des acides aminés est fonction de la concentration en acide.
- De la neutralité à NaOH 1N : les réactions de MAILLARD entraînent un effondrement des acides aminés.
- NaOH 1N - 6N : la stabilité des acides aminés est proportionnelle à la concentration de l'alcali.

3.3. Influence de l'humidité

Parmi les facteurs intervenant sur l'évolution des réactions de MAILLARD, l'humidité prend une place particulière.

Dans un milieu strictement anhydre, on peut considérer que la réaction de MAILLARD, est pratiquement nulle. Le brunissement augmente ensuite avec l'humidité relative d'équilibre du milieu, passe par un maximum, diminue au-delà d'une limite de l'humidité relative, et puis redevient nul dans des solutions très diluées (LEA et HANNAN, 1949 ; RICHARDS, 1956 ; LONCIN et al., 1965 ; BIMBENET, 1969). Ce maximum se place généralement selon le type de produit entre les valeurs de l'humidité relative d'équilibre de 0,30 et 0,70 (EICHNER et KAREL, 1972).

Une explication a été donnée à ce phénomène par LONCIN et al. (1965), qui ont réalisé les réactions de Maillard en milieu liquide à l'humidité relative d'équilibre variable. Les essais ont été effectués dans des milieux eau-ethanediol à diverses compositions. Ils ont alors montré que la présence d'eau était défavorable à la réaction dans toute la gamme d'humidité relative d'équilibre. Les observations analogues ont été faites par EICHNER et KAREL (1972). Les auteurs ont ensuite conclu que l'eau possède toujours une influence défavorable, non seulement par la dilution du milieu, mais surtout étant un des produits des réactions de Maillard, joue un rôle inhibiteur sur les réactions ; tandis qu'en milieu solide, l'eau a un rôle physique favorisant la mise en contact des groupements réactionnels, ce qui explique donc les courbes à maxima, que l'on observe.

En tenant compte de l'action de l'eau, on peut conclure que les traitements thermiques en milieu peu hydraté, sont plus favorables pour le développement des réactions de Maillard, que les procédés faisant appel à un milieu humide (cuisson à l'eau, autoclavage).

3.4. Facteurs divers

L'influence de l'oxygène sur le déroulement des réactions de Maillard n'est pas claire. Dans le passé, ceci a fait l'objet d'un petit nombre de travaux où règnent des opinions très divergentes.

Les réactions de Maillard par définition, se produisent aussi bien à l'air, qu'à l'abri de l'air (MAILLARD 1916). La présence d'oxygène ne semble donc pas une condition essentielle (OLCOTT et DUTTON 1945 ; KATO 1956). Néanmoins, certains auteurs ont montré l'action inhibitrice de l'oxygène sur le brunissement (BOHART et

CARSON 1955). Tandis que pour d'autres, l'oxygène atmosphérique favorise les réactions de Maillard (WEBB 1935 ; JOHANSEN et NICKERSON, 1949 ; VOLGUNOV et POKHNO 1950).

Cependant, à la lumière des travaux récents, il semble que l'oxygène atmosphérique ou les agents oxydants comme l'eau oxygénée ou le permanganate de potassium peuvent jouer un rôle actif dans la destruction des mélanoidines par la chaleur.

GOMYO et al. (1972) ont étudié le comportement d'une solution de mélanoidines au cours du chauffage en présence et en absence de l'oxygène.

A cet effet, la solution brun-noir obtenue par le chauffage d'un système modèle xylose-glycocolle a été dialysée et la fraction non dialysable a été lyophilisée.

D'après les auteurs, dans des conditions aérobiques, la coloration d'une solution aqueuse des mélanoidines ainsi préparée diminue de l'ordre de 30 % par le chauffage à 90°C pendant 10 heures. Le taux de décoloration atteint à 50 % au bout de 48 heures. D'autre part, les auteurs signalent que cette décoloration correspond au développement d'une fluorescence, à l'apparition des peroxydes, à une diminution de la teneur en réductones dans le milieu. Dans le dialysat obtenu à partir de ce milieu les auteurs ont trouvé des réductones, des amines aromatiques et aliphatiques, les composés carbonylés, et du glycocolle. Par contre, le traitement à la chaleur d'une solution de mélanoidines dans des conditions anaérobiques ne provoque pas de tels changements. La coloration s'intensifie et on observe ensuite une précipitation, ce qui indique que les réactions de polymérisation de condensation se poursuivent. Le taux de réductones augmente également jusqu'à une certaine valeur et puis il reste constant.

L'influence de l'eau oxygénée sur le brunissement d'un système modèle de diacétyle-glycocolle ainsi que sur la destruction des pigments bruns formés à partir de ce modèle ont été étudiées par POKORNY et al. (1973).

Il a été constaté que l'eau oxygénée inhibait la réaction de brunissement d'un tel système au cours du stockage à 60° C et cela se produisait notamment lorsque la glycocolle se trouvait en excès dans le milieu. Dans le cas d'un excès de diacétyle, l'inhibition était moins prononcée. D'autre part, la solution brune obtenue par le chauffage du système modèle, se décolorait par l'addition de l'eau oxygénée et cela dépendait aussi de la concentration initiale de l'un des deux composés.

D'après les auteurs, le rôle de l'eau oxygénée se situerait à plusieurs niveaux. Elle réagit avec la glycocolle en la décomposant d'une manière analogue à la dégradation de Strecker. Les produits de dégradation réagissent ensuite avec le diacétyle. Il se forme alors des produits incolores comme le diméthylimidazole et le triméthylimidazole. Elle peut également réagir avec le diacétyle en formant de l'acétaldéhyde. Ce dernier peut participer aux réactions de brunissement en aboutissant à la formation des produits plus ou moins colorés. En dernier lieu, l'eau oxygénée décompose les produits de condensation du diacétyle avec la glycocolle.

VELISEK et DAVIDEK (1974) signalent que la dégradation oxydative des pigments bruns peut avoir lieu même à la température ambiante, mais pendant une période relativement longue. Alors qu'en présence des agents oxydants comme KMnO_4 , HNO_3 , H_2O_2 et avec l'application de la chaleur, la décoloration des solutions de mélanoidines est fortement accélérée. Cette dégradation oxydative de mélanoidines donne lieu à la

libération des amines correspondant à l'acide aminé mis en oeuvre.

Les réactions de MAILLARD peuvent être catalysées ou inhibées par la présence de certains ions minéraux ou organiques.

Les travaux de SAUNDERS et JERVIS (1966) ont montré l'effet catalytique des anions tels que les phosphates, citrates et acétates dans la réaction entre le glucose et la glycolle. KATO et al. (1969) ont étudié l'influence de différents anions carboxyliques et le phosphate sur la réaction de la glycolle avec le glucose et avec le fructose à 100°C. Ils ont constaté une nette accélération des réactions de MAILLARD en présence des anions phosphate, citrate et acétate, les effets catalytiques étaient beaucoup plus marqués dans le système modèle glucose-glycolle.

Les travaux plus récents de BOBBIO et al. (1973) confirme l'influence catalytique de ces anions sur le déroulement des réactions entre glucose et glycolle dans des conditions de température moins vigoureuses (47°C). D'autre part, HASHIBA (1973) a montré le rôle important de différents acides organiques tels que l'acide lactique, acétique, citrique, pyruvique et succinique dans le brunissement de la sauce de soja.

L'action catalytique de ces anions se situerait au niveau du réarrangement d'Amadori et de la décomposition des cétose-amines. Plusieurs auteurs ont montré que ces réactions exigent une catalyse acide-base (voir par exemple REYNOLDS, 1963).

La présence de certains métaux, même en traces, peuvent modifier l'intensité des réactions de MAILLARD.

WEBB (1935) a observé que le fer et le cuivre catalysaient le brunissement d'une solution de lactose en présence d'un acide aminé et que l'étain freinait, au contraire, la réaction. BOHART et CARSON (1955) estiment d'autre part que l'intensité de coloration d'une

solution de glucose-glycocolle chauffé à 50°C à l'air, augmente en présence d'ions ferriques. L'addition d'une quantité de 2 ppm de perchlorure de fer dans le milieu réactionnel accélère fortement le brunissement. Les auteurs par contre, ont trouvé que les ions de manganèse (Mn^{+2}) inhibaient le brunissement du même système modèle. Ils ont observé une inhibition très significative par la présence de 0,4 ppm de chlorure de manganèse.

ADRIAN et FAVIER (1961), de leur part, ont étudié l'influence d'un certain nombre de métaux sur la perte de la lysine au cours de la réaction avec le glucose et ils n'ont pas observé une interférence particulière de l'un de ces métaux sur la stabilité de l'acide aminé.

D'après GOMYO et al. (1972), la présence des métaux transitionnels comme Fe^{+3} , Cu^{+2} à l'exception de Mn^{+2} peut freiner la décoloration des mélanoidines pendant le chauffage en présence de l'oxygène.

1.1.4. Les réactivités des composants

Les réactions de MAILLARD demandent pour se développer la présence d'un composé carbonylé aminé. La nature de ces composants influence d'une part la vitesse des réactions, d'autre part, elle joue un rôle déterminant du point de vue qualitative sur les produits intermédiaires et finaux des réactions.

4.1. Réactivité des sucres

La nature du sucre a une grosse importance dans le développement de la coloration et des réactions. Les sucres à fonction alcool ne produisent ni brunissement, ni réaction de MAILLARD, ces phénomènes exigeant la présence d'une fonction aldehydique ou cétonique (ADRIAN et al., 1961 ; POMERANZ et al., 1962).

D'une manière générale, en se basant sur des taux isomoléculaires, les sucres réagissent d'autant plus que leur chaîne carbonée est plus courte. Ainsi, les pentoses apparaissent très réactifs, suivis par les hexoses, puis par les dissacharides.

D'autre part, il existe aussi une différence de réactivité parmi les sucres isomères. Par exemple, parmi les aldopentoses, le ribose apparaît le plus actif suivi par l'arabinose et le xylose. Dans le cas des aldohexoses, c'est le galactose qui a la plus forte réactivité vis-à-vis des acides aminés. Viennent ensuite le mannose et le glucose. On classe généralement les cétohexoses entre les aldopentoses et les aldohexoses du point de vue de leur réactivité et c'est le sorbose qui réagit le plus avec les acides aminés (ELLIS, 1959; POMERANZ et al., 1962 ; BURTON et MCWEENY, 1963). Les brunissements produits par les dissacharides sont en général beaucoup moins intenses que par les oses. Cependant, il existe également une hiérarchie parmi ces sucres : le mélibiose, le lactose et le maltose.

Le comportement d'un sucre dans les réactions de MAILLARD peut être déterminé d'après sa configuration stéréochimique.

En effet, il a été trouvé un parallélisme entre la proportion d'aldehyde libre (la forme chaîne-ouverte), la vitesse de mutarotation d'un sucre d'une part, et sa réactivité dans les réactions de MAILLARD d'autre part (ARAYA, 1947 ; TRAITTEUR, 1951 ;

KATCHALSKY et SHARON, 1953). En d'autres termes, plus la proportion de la forme stable (hemiacétale) du sucre augmente, moins il est actif dans les réactions de MAILLARD.

La nature du sucre n'influence guère qualitativement les produits carbonylés formés au cours de la réaction. Néanmoins, les quantités de divers produits carbonylés augmentent selon l'ordre de réactivité donné ci-dessus. (ROONEY et al., 1967):

Les sucres réducteurs ne sont pas les seuls à réagir avec les acides aminés dans les produits alimentaires. Un grand nombre de composés carbonylés formés par des mécanismes très divers peuvent également participer aux réactions de brunissement.

Parmi ces substances, notamment les aldéhydes non saturés et les composés alpha-dicarbonylés sont particulièrement actifs vis-à-vis des composés aminés (HODGE, 1953). Ils peuvent être à l'origine des brunissements intenses qu'on observe dans certains produits à des conditions de température peu sévères (JANICEK et POKORNY, 1971 ; POKORNY et al., 1973, a et b ; CHUYEN et al., 1973).

4.2. Réactivité des acides aminés

La réactivité des acides aminés vis-à-vis des oses, varie considérablement d'après leur nature, par conséquent, les répercussions des réactions de MAILLARD varient selon l'acide aminé mis en jeu.

D'une manière générale, l'action des acides aminés est proportionnelle à la distance entre le carbone alpha de leur molécule et leur groupement aminé. Par exemple, la beta alanine produit une coloration beaucoup plus intense que l'isomère alpha (UNDERWOOD et al.

1959) . D'après KUBOTA (1941), le groupement carboxylique de l'acide aminé aurait un effet inhibiteur sur la réactivité du groupement aminé et cet effet dépend de la distance entre deux groupements. C'est la raison pour laquelle, les acides beta aminés sont plus réactifs que les acides alpha aminés. Cet auteur a également signalé que l'esterification du groupement carboxylique causait une augmentation dans la vitesse des réactions.

L'importance de la position et le nombre du groupement aminé dans la réactivité des amino acides a été signalé également par LENTO et al. (1958) .

En mesurant l'intensité de coloration formée par la réaction de différents types d'acides aminés avec le glucose, ces auteurs ont montré que les acides diaminés comme la lysine, avaient la plus forte réactivité. Dans le cas des acides mono aminés, la réactivité dépend d'une part de la position du groupement aminé et d'autre part du nombre d'atome de carbone dans leur molécule. Les acides comportant leur groupement aminé en position terminale, produisent plus de coloration que les acides alpha aminés. Dans ce groupe, la réactivité augmente de 2 à 4 atomes de carbone, au delà, elle diminue. Alors que la réactivité des acides alpha aminés augmente légèrement en fonction du nombre d'atome de carbone dans leur molécule.

L'influence des acides aminés sur la formation de coloration et de la précipitation des mélanoidines et leur destruction dans les réactions de MAILLARD a été systématiquement étudié par ADRIAN, (1961, 1963, 1965), dont voici les conclusions principales :

- L'influence des acides aminés sur la coloration est sous la dépendance à la fois de la nature de l'acide aminé et du pH de la solution, à l'exception du tryptophane. C'est

dans le milieu faiblement alcalin que l'action des acides aminés est la plus marquée, alors qu'elle disparaît totalement pour des pH plus élevés.

- La nature des acides aminés ne se répercute pas de la même manière sur la coloration et la précipitation des mélanoidines. Ce qui semble certain, c'est que les acides aminés modifient plus intensément la coloration que le taux de mélanoidines précipitées.
- La stabilité des acides aminés est proportionnelle à l'acidité du milieu, et leur destruction d'autant plus intense que l'on approche d'un milieu de pH 10 environ (sauf le tryptophane).

La nature de l'acide aminé conditionne dans une large part la formation de flaveur au cours des réactions de MAILLARD. Comme il a été indiqué dans les chapitres précédents les acides aminés se dégradent, en présence de produits dicarbonylés, en donnant des aldehydes caractéristiques (dégradation de STRECKER). Ainsi, l'alanine fournit essentiellement de l'acetaldehyde, la leucine de l'isovaleraldehyde, la valine de l'isobutyraldehyde, etc..., quelque soit la nature du sucre mis en jeu, (ROONEY et al. , 1967).

4.3. Réactivité des peptides et des protéines

Les peptides sont très largement répandues dans de nombreux produits alimentaires . Grâce à leurs groupements aminés libres, ces substances peuvent parfaitement prendre part dans les réactions de MAILLARD.

Cependant, les chercheurs se sont peu intéressés à ces composés aminés du point de vue de leur comportement dans ces réactions.

Les travaux de KATCHALSKY (1941) sur la réaction du glucose avec différents acides aminés et des peptides ont montré que la réactivité d'une peptide dépendait essentiellement de la nature de l'acide aminé qui se trouve en position terminale de la chaîne peptidique.

En se basant sur l'abaissement du pH du milieu réactionnel, cet auteur a déterminé les constantes d'équilibre de la réaction du glucose avec les acides aminés et les peptides. Les valeurs obtenues dans les systèmes modèles contenant les glycyl-peptides étaient très largement supérieures aux valeurs obtenues avec les acides aminés (glycocolle, alanine et leucine) ou leucyl et les alanyl-peptides.

LUERS et LAMPL (1955) ont fait une étude comparative sur les réactivités d'un acide aminé (glycocolle), d'un dipeptide (glycyl-glycocolle) et d'un tripeptide (glycyl-glycyl-glycocolle) avec le glucose.

L'intensité de coloration formée par le chauffage à 100°C pendant 2 heures à pH 5 d'une solution de glucose en présence du dipeptide ou du tripeptide était environ six fois supérieure à celle formée en présence de la glycocolle. Cependant, ces auteurs ont

également constaté qu'avec l'augmentation du pH du milieu, l'écart entre les colorations diminuait. Ainsi, à pH 6, le dipeptide donnait une coloration 2,8 fois, et le tripeptide 1,7 fois supérieure à celle de l'acide aminé. A partir de pH 7, la coloration obtenue avec la glycocolle dépassait celles obtenues avec les peptides.

D'après les auteurs, la faible activité du tripeptide par rapport au dipeptide peut être expliquée par la structure spirale de sa molécule. Ainsi, la distance entre le groupement aminé libre et le groupement carboxylique d'un tripeptide serait plus courte que celle dans la molécule de dipeptide.

Récemment, CHUYEN et al., (1973) ont réalisé une étude détaillée sur la réaction des peptides avec les différents composés carbonylés. Ils ont tout d'abord confirmé les résultats de LUERS et LAMPL, (1955) en ce qui concerne la réactivité des peptides par rapport à celle des acides aminés. L'intensité de brunissement des solutions des peptides, quelque soit le composé carbonylé mis en jeu, (l'alcétaldehyde, glyoxal, glucose) était beaucoup plus élevée que celle des acides aminés, et on observait la même chose lorsque la concentration de l'acide aminé était 2 ou 3 fois supérieure à celle des peptides (0,2 mol.)

Afin de mettre en évidence l'ordre de réactivité des différents peptides et acides aminés, les solutions de di-, tri- et tetraglycocolle ont été chauffé à 80°C à pH 5 en présence du glyoxal. Dans ces conditions, la solution contenant 0,2 mol. de tetraglycine donnait la plus intense coloration suivie par le triglycocolle et le diglycocolle. Venaient ensuite l'alanylalanine, la glycocolle et l'alanine.

Ces résultats ne sont pas tout à fait en accord avec ceux de LUERS et LAMPL (1955). Néanmoins, CHUYEN et al. (1973) pensent que cet ordre de réactivité des peptides est parfaitement logique.

En effet, dans leurs travaux précédents (FUJIMAKI et al., 1971), ces auteurs avaient montré l'importance de la valeur pK_2 des composés aminés dans leur réactivité. Les valeurs pK_2 des peptides étant plus basses que celles des acides aminés étudiés, à pH 5, la concentration des formes actives des peptides sera plus élevée que celle des acides aminés et cela, en fonction du nombre d'acides aminés inclus dans leur molécule.

Les groupements aminés libres des protéines peuvent réagir avec les oses. Dans les premières étapes des réactions, les propriétés physiques de la protéine restent peu changées. Dans les étapes ultérieures, la protéine prend une coloration brune, son poids moléculaire augmente et elle se coagule. On constate, par ailleurs, une diminution considérable dans sa valeur nutritionnelle (REYNOLDS, 1965).

La réactivité d'une protéine dans les réactions de Maillard se détermine en grande partie par la nature des résidus d'acides aminés inclus dans sa chaîne. Cependant, il a été trouvé une différence considérable entre la réactivité de ces résidus d'acides aminés et celle des acides aminés libres.

En effet, parmi les amino acides inclus dans une protéine, les basiques, notamment la lysine, présentent une réactivité extrêmement forte. Viennent ensuite les acides aminés soufrés, méthionine et cystine, tandis que d'autres résidus d'acides aminés restent presque intacts, après un traitement thermique en présence d'oses (LEA et HANNAN, 1950 ; ADRIAN, 1967).

La destruction d'une quantité considérable de lysine incluse dans les protéines au cours des réactions de MAILLARD, ne peut tenir qu'à son caractère diaminé et à la situation de son groupement ϵ aminé.

Tout laisse croire que la coupure des chaînes peptidiques dans leur longueur est difficilement réalisable par les réactions de MAILLARD et que les réactivités faibles observées des acides mono aminés ne correspondent qu'aux molécules terminales des chaînes (FRAGNE, 1972).

Au contraire, les liaisons entre les chaînes parallèles semblent plus fragiles et les groupements aminés réalisant ce type de liaison sont très réactifs, c'est-à-dire les groupements aminés secondaires de la lysine et de l'arginine.

L'évolution de la lysine au cours d'un traitement thermique constitue donc un indice sensible des répercussions qui peuvent en résulter (ADRIAN, 1967).

ADRIAN et FRAGNE, (1972), dans une étude détaillée sur les réactivités d'une série de protéines purifiées, ont montré qu'il existait une relation directe entre la teneur en lysine d'une protéine et le pourcentage de destruction pendant les réactions de MAILLARD. C'est pourquoi, les albumines ou les globulines sont plus endommagées que les protéines du gluten par exemple.

Cependant, ces auteurs ont également conclu que les différences de réactivités entre protéines sont moins importantes que celles enregistrées avec des sucres de nature variée. C'est pourquoi, on doit considérer que le sucre est un facteur plus important que la protéine pour définir l'intensité de la réaction de MAILLARD.

1.1.5. Inhibition des réactions de MAILLARD

L'étude des méthodes d'inhibition ou de contrôle des réactions de MAILLARD porte un intérêt considérable dans l'industrie alimentaire.

Le contrôle des facteurs physiques tels que la température, l'humidité, le pH pendant le processus peut être efficace dans une certaine mesure pour freiner les brunissements. Cependant, une inhibition complète ne peut être obtenue en agissant sur ces paramètres pour des raisons aussi bien techniques qu'économiques.

Dans certains cas où le produit alimentaire ne contient que de faibles quantités de l'une des substances réactionnelles de réactions de MAILLARD, il est possible de la convertir dans une forme inactive par divers moyens. Par exemple, pour empêcher le brunissement du blanc d'oeuf pendant le séchage on peut transformer le glucose dont la teneur est faible dans le blanc d'oeuf, en éthanol par la fermentation alcoolique à l'aide de la levure, avant l'opération. Cet effet peut être également obtenu par l'utilisation directe d'un mélange d'enzymes contenant de la glucose oxydase et de la catalase. La première transforme le glucose en acide gluconique (qui ne réagit pas avec les protides) et en hydrogène peroxyde, la deuxième agit sur l'hydrogène peroxyde (HENDRICKSON, 1956).

Par contre, l'utilisation des inhibiteurs chimiques est beaucoup plus répandue dans l'industrie alimentaire, pour la raison de leur simplicité d'application dans la plupart des produits.

5.1. Inhibition par le SO_2

Le SO_2 est fréquemment utilisé sous la forme de bisulfite, notamment pour contrôler le brunissement des fruits et des légumes au séchage, ou au stockage.

L'effet de SO_2 comme inhibiteur n'est pas absolu, en fait, cette substance retarde temporairement le brunissement. Lorsqu'on chauffe un mélange de sucre et d'acide aminé en présence de $NaHSO_3$, le mélange reste d'abord clair, puis jaunit : le pigment jaune s'accumule progressivement et après un certain temps, la coloration brune apparaît et va en s'intensifiant. Ce brunissement commence à se manifester lorsque l'odeur de SO_2 disparaît du milieu (PETIT, 1959).

Le mécanisme d'inhibition des réactions de MAILLARD par les bisulfites a fait l'objet de plusieurs travaux, et différentes hypothèses ont été émises à ce sujet.

Les recherches effectuées dans ce domaine ont été passées en revue par REYNOLDS (1965) et plus récemment par HURST (1972) et par MCWEENY et al. (1974).

En premier lieu, on a supposé que le bisulfite réagissait avec la fonction aldehydique du sucre pour former un dérivé bisulfitique (GEHMAN et OSMAN, 1954 ; JOSLYN et BRAVERMANN, 1954), la chaîne de réactions étant ainsi bloquée dès son origine ; mais différents indices ne sont pas en faveur de cette explication simple. En effet, dans ses plus récents travaux, INGLES (1959, 1960, 1961, 1962) a montré que le bisulfite pouvait prendre part à cinq types de réactions :

- a) Formation d'un dérivé bisulfitique avec des sucres réducteurs ;
- b) Oxydation des sucres réducteurs aux acides aldoniques correspondants avec la réduction simultanée de sulfite en soufre ;

- c) Esterification des sucres réducteurs pour donner, par exemple, glucose 6-sulfate ;
- d) Réactions aboutissant à la formation de l'acide sulfopropionique ;
- e) Sulfonations des déoxyhexosones.

Selon BURTON et al., (1962, 1963), les composés carbonylés sont des précurseurs très importants des pigments bruns dans les réactions de MAILLARD, et l'inhibition de brunissement par les bisulfites est due en grande partie, à la combinaison des bisulfites avec ces composés carbonylés, notamment non-saturés.

L'effet de la méthode d'application et de la quantité de sulfite sur le brunissement non enzymatique des pomme de terre pendant le séchage a été étudié par HENDEL et al., (1955). D'après leurs travaux, la pulvérisation d'une solution diluée d'un sel de sulfite, est beaucoup plus efficace que l'addition de SO_2 dans l'air séchant.

Ces auteurs ont également montré qu'en augmentant la teneur en sulfite des produits de 400 ppm à 1000 ppm, on obtenait une protection moins importante qu'en abaissant l'humidité de 7 à 4 % (avec une teneur en sulfite de 570 ppm).

5.2. Inhibition par les thiols

La cystéine retarde le brunissement du blanc d'oeuf desséché par la formation de l'acide thiazoline carboxylique avec le glucose (LIGHTBODY et FEVOLD, 1948). D'autre part, GUSS (1952) a signalé que la réaction de brunissement entre le glucose et la glycine était inhibée par l'addition des thiols tels le 2-mercapto-ethanol ou l'acide mercapto-acétique.

Néanmoins, ces substances ne peuvent pas être utilisées comme inhibiteurs de brunissement dans l'industrie alimentaire à cause

de leurs déplaisantes propriétés.

5.3. Inhibition par d'autres substances

SIMON et al., (1955) ont signalé que le chlorure de calcium inhibait le brunissement des pommes de terre. Ils supposent que l'effet inhibiteur est dû probablement à la chélation du calcium avec les acides aminés. Selon REYNOLDS, (1965), le chlorure de calcium seul est beaucoup plus efficace comme inhibiteur que le bisulfite, mais les meilleurs résultats ont été obtenus avec ces deux substances en combinaison (BURTON et al., 1963).

D'autres substances encore ont été signalées comme inhibiteurs par plusieurs auteurs : le formaldéhyde (DUTOIT et al., 1932), l'acide formique, le benzaldéhyde, l'acide benzène phosphorique (KRISTER, 1943), l'hydroxylamine, l'hydrazine (BARNES et KAUFMAN, 1947).

1.1.6. Réaction de MAILLARD dans l'industrie brassicole

A l'époque où MAILLARD a mis en évidence les réactions de brunissement entre les oses et les acides aminés, LINTNER (1912, 1913), montrait l'existence des mélanoidines dans le malt touraillé, RUCKDESCHEL (1914), de sa part, signalait un décroissement considérable dans la teneur en azote formol du malt en touraille, dû probablement à ces réactions. Depuis ces premières constatations, les réactions de MAILLARD et ses répercussions technologiques dans cette industrie ont fait l'objet d'un certain nombre de travaux. C'est ainsi que le rôle primordial de ces réactions dans la formation de la couleur et de l'arôme, est reconnu en malterie-brasserie. Cependant, malgré cette grande

importance dans les diverses qualités du produit fini, les travaux effectués jusqu'à présent n'ont apporté guère de précisions sur la formation de mélanoidines, dans cette industrie.

Quoi qu'il en soit, nos connaissances actuelles nous permettent de dire que l'intensité des réactions de MAILLARD, varie selon les conditions qui se présentent dans les différents stades de la fabrication. C'est pourquoi, dans cette partie de notre exposé, nous allons évoquer les points où ces réactions peuvent intervenir dans la chaîne des opérations de malterie-brasserie.

6.1. Réactions de MAILLARD AU MALTAGE

Le trempage a lieu à la température assez basse, pendant un temps relativement court, à une hydratation élevée et en plus, l'orge ne contient que des quantités faibles de substances réactives. Il est évident qu'aucune réaction de MAILLARD ne peut se développer dans ces conditions.

La germination peut être considérée comme un stade préparatoire très important. Car, du point de vue de la composition chimique, les actions hydrolytiques de divers systèmes enzymatiques donnent naissance à des quantités importantes de petites molécules réactives. En effet, la dégradation de l'amidon, des hemicelluloses et des gommes de l'orge par les amylases, les beta-glucanases et les pentosanases entraîne une accumulation considérable des sucres réducteurs, tels que le glucose, fructose, maltose, arabinose, xylose, etc... Les pentoses (qui sont extrêmement réactifs dans les réactions de MAILLARD) n'existant pas dans l'orge, apparaissent au cours de la germination. Le tableau (I) indique l'évolution de divers sucres simples de l'orge en germination.

TABLEAU (I) : Evolution des sucres simples au cours de la germination. (Les résultats sont exprimés en % de M.S.)

SUCRES	TENEUR	JOURS DE GERMINATION							
	dans								
	L'ORGE	1	2	3	4	7	9	10	
Fructose	0,07	0,07	0,09	0,16	0,31	0,27	0,47	0,53	
Glucose	0,02	0,05	0,10	0,22	0,36	0,73	1,05	1,13	
Saccharose	1,07	0,51	0,72	0,42	0,58	1,09	1,71	1,85	
Maltose	Trace	0,01	0,01	0,08	0,11	0,43	0,62	0,67	
Maltotriose	-	-	-	-	0,03	0,09	0,42	0,53	
Raffinose	0,29	0,17	0,02	-	-	-	-	-	
Xylose + Arabinose	-	-	-	Trace	0,01	0,01	0,05	0,05	

(D'après HARRIS et Mc WILLIAM, (1954))

TABLEAU (II) : Evolution des acides aminés libres dans l'orge
en germination

	TENEUR dans L'ORGE	JOURS DE GERMINATION				
		1	2	4	6	8
A. ASPARTIQUE	9,2	15,5	18,3	17,0	19,6	18,9
THREONINE	1,3	7,5	9,3	21,0	20,2	23,2
SERINE + AMIDES	18,0	31,8	42,2	107,0	102,8	89,3
A. GLUTAMIQUE	14,8	29,1	26,5	35,8	29,9	29,1
PROLINE	4,2	12,2	41,2	178,9	278,3	292,1
GLYCINE	4,3	5,5	5,8	12,6	11,4	12,2
ALANINE	7,9	30,9	26,2	28,6	31,0	32,4
CYSTINE	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
VALINE	2,6	10,7	16,3	40,7	48,5	45,5
METHIONINE	0,3	1,4	2,5	8,6	7,7	6,6
ISOLEUCINE	0,9	4,2	6,8	23,3	25,6	25,0
LEUCINE	1,4	8,0	14,6	49,8	49,6	43,5
TYROSINE	1,2	3,7	6,9	22,3	26,6	26,6
PENYLALANINE	1,5	6,0	10,9	37,0	46,0	45,7
TRYPTOPHANE	3,7	5,3	6,3	12,6	13,2	14,7
LYSINE	2,2	4,7	7,7	21,4	28,4	28,8
HISTIDINE	2,2	5,2	6,8	13,2	15,3	16,1
ARGININE	2,3	4,5	6,7	30,3	36,8	38,9
NH ₃	8,4	15,9	23,9	55,9	56,3	51,4
Alpha-AMINO N	78,0	186,2	255,0	660,1	790,9	788,6

Les teneurs sont exprimées en µg N alpha-aminé / g. MS.

(D'après JONES et PIERCE, 1963)

.../...

D'autre part, la dégradation des protéines de l'orge par des enzymes protéolytiques a lieu en grande partie dans ce stade. Ainsi se forment les acides aminés libres, les peptides et les polypeptides. Dans le tableau (II), où nous donnons, d'après les travaux de JONES et PIERCE (1963), l'évolution des acides aminés libres pendant la germination, on voit l'accumulation considérable de ces substances dans l'orge en germination.

C'est ainsi que l'orge germée possède un potentiel important pour la formation des mélanoïdines, dans les étapes ultérieures de la fabrication ; les étapes ultérieures seulement, car là encore étant donné la température et l'hydratation, il ne semble pas qu'une réaction notable puisse se développer à ce stade.

Nous en arrivons au touraillage où toutes les conditions pour le développement des réactions de Maillard se trouvent réunies : la température, l'hydratation, la composition chimique.

La première phase du touraillage dite du séchage présente un double aspect : étant donné l'état de l'hydratation du malt vert (40 / 50 %) et la température de séchage (40 - 60°C sous le plateau), les activités enzymatiques se trouvant dans des conditions favorables, se poursuivent beaucoup plus intensément. Les réactions de Maillard peuvent se développer également dans ces conditions.

Les enzymes travaillent activement pendant la phase de dessiccation. Leur optimum d'activité se trouve entre 45° et 60°C, pour la plupart, ils se trouvent donc dans de bien meilleures conditions de température qu'au germe. Leur activité sera surtout fonction de l'humidité du malt.

Ce stade "enzymatique" du touraillage a une importance particulière, car les réactions enzymatiques qui s'y déroulent, peuvent jouer un rôle déterminant sur la formation de la couleur et de l'arôme du malt, dans les étapes ultérieures du touraillage. En effet, dans la pratique, pour fabriquer des malts pâles, on s'efforce de les sécher autant que possible à basse température (inférieure à 45°C sous le plateau), afin d'éviter les dédoublements enzymatiques, en augmentant le tirage ou la ventilation, l'évaporation peut être activée d'une manière à ce que le taux d'humidité soit descendu à 10 %, avant la montée de la température au degré de coup de feu. Pour fabriquer des malts foncés on procède tout à fait de façon opposée. Le séchage se fait lentement à des températures élevées (50 - 60°C sous le plateau), jusqu'à un degré d'humidité de 20 - 28 %. On ventile beaucoup moins, de ce fait, l'évaporation est beaucoup moindre. L'humidité est conservée essentiellement par le recyclage de l'air humide sur le plateau. L'ascension de température au degré de coup de feu, se fait lentement. Ainsi, les enzymes se trouvant dans un milieu favorable, ont une activité accélérée, ce qui a pour résultat de la formation d'une grande quantité de petites molécules réactives.

Cependant, on ne connaît pas encore parfaitement les effets de ces diverses actions enzymatiques au séchage qui est un milieu d'hydratation variable.

Néanmoins, nous trouvons des renseignements sur l'évolution des composés carbohydratés du malt au touraillage dans l'article de HALL et al. (1956). Ces auteurs ont trouvé que les teneurs en fructose, glucose, saccharose et pentosanes de faible poids moléculaire, augmentaient pendant la première partie de séchage, tandis que les con-

centrations de maltose et de maltotriose, restaient pratiquement inchangées, ce qui était surprenant. Dans leurs très récents travaux NARZISS et al., (1973), ont étudié l'influence du séchage sur le développement des enzymes et de quelques autres groupes de substances du malt. Ils ont trouvé une augmentation marquée des enzymes hydrolytiques, tels que les alpha-amylase, beta-amylase, endo-beta-glucanases, endopeptidase et exopeptidase, notamment pour les faibles températures de 35 à 50°C. A partir de 65°C les enzymes commencent à perdre leurs activités. Les polyphenoloxydases, peroxydases, cellobiases et exo-beta-glucanases diminuent pendant le séchage, lorsque la température s'élève : le coup de feu accentue ces pertes. Ces auteurs ont également montré que la teneur en sucres du malt augmente pendant le séchage, notamment dans la couche supérieure.

L'évolution des acides aminés au touraillage a été récemment étudié par SCRIBAN et DUPONT (1973). Il a été trouvé qu'il y avait libération des acides aminés liée à l'action de peptidases et carboxypeptidase, pendant la première partie du séchage. Selon NARZISS et al., (1973), la nature des acides aminés libérés dépend de la température de séchage. Ainsi, par exemple, ils ont constaté pour des températures de séchage peu élevées une augmentation de thréonine, glycylalanine et phenylalanine. Des températures plus élevées favorisaient, par contre, la libération de glycine, alanine, tryptophane, acide glutamique et arginine.

Nous trouvons peu de renseignements dans la littérature, concernant le déroulement des réactions de MAILLARD au séchage. La diminution dans la teneur en acides aminés observée à la fin du séchage peut être attribuée à ces réactions (SCRIBAN et DUPONT, 1973). Mais il ne semble pas certain que leur développement atteigne les stades de la formation des substances colorées, avant la montée de la température au degré du coup de feu.

.../...

Un fait très curieux a été signalé par SCRIBAN, (1971). C'est la présence d'un inhibiteur des réactions de brunissement dans le malt vert. Selon l'auteur, cet inhibiteur commence à être détruit lentement vers 60 - 70°C, durant la seconde partie du séchage : la destruction est très rapide, dès le début de coup de feu. On ignore la nature et le mode d'action de cet inhibiteur qu'il serait intéressant de mieux connaître.

Le malt vert est desséché jusqu'à un degré d'humidité de 10 % environ, en fin de cette première phase de touraillage. Les transformations enzymatiques se trouvant très limitées dans ces conditions, l'élévation de la température au degré de coup de feu, donne l'occasion aux réactions purement chimiques : réactions de MAILLARD, caramélisation des oses, etc... Ainsi se forment la plupart des substances colorées et aromatiques du malt.

Le rôle important joué par la température du coup de feu sur le développement de ces réactions a été signalé par plusieurs auteurs (ISABAERT, 1965 ; BARRET et al., 1967 ; SCRIBAN, 1971 ; SCRIBAN et DUPONT, 1973). Par exemple, SCRIBAN et DUPONT (1973) ont montré qu'à partir de 80°C, couleur, surcoloration et leurs différences augmentaient proportionnellement au temps. Les gradients d'augmentation de couleur et de surcoloration sont distincts à chaque température et particulièrement évolutifs entre 80 et 85°C. Rappelons que, étant données les conditions de température de coup de feu, la coloration qui se forme dans le malt à ce stade est due principalement aux réactions de MAILLARD.

Dans la littérature, on ne trouve pas de données précises concernant l'évolution des sucres réducteurs du malt au cours du coup de feu.

L'évolution de l'azote alpha-aminé a été étudiée par BARRET et al., (1967). Ils ont constaté une diminution progressive associée à une augmentation de la couleur pendant le coup de feu. Par contre, SCRIBAN et DUPONT, (1973) ont observé des variations très irrégulières des teneurs en azote alpha-aminé tout au long du coup de feu. Ces auteurs signalent également qu'une libération d'azote alpha-aminé (ninhydrine positive) peut avoir lieu à ce stade. Les analyses des acides aminés libres indiquent cependant une légère diminution de la teneur en acides aminés basiques et une augmentation de celle des acides aminés acides et neutres durant le coup de feu.

Les études plus directes sur le déroulement des réactions de Maillard au touraillage ne sont que peu nombreuses. On trouve quelques renseignements dans la revue générale de BATHGATE, (1973) sur la biochimie du touraillage.

L'article récent de YOSHIDA et al., (1972) traite de l'isolement, de l'identification et de la formation de quelques produits des réactions de Maillard dans le malt. En étudiant l'évolution des acides aminés au maltage et au brassage, ces auteurs ont constaté sur le diagramme d'un autoanalyseur d'acides aminés, un groupe de substances ninhydrine-positives qui se distinguaient des autres acides aminés. Dans leurs travaux ultérieurs, ils ont montré que ces substances se formaient dans le malt pendant le touraillage et surtout notamment au coup de feu et que leur quantité dans le malt était également influencée par la température de germination.

Ces substances ont été isolées et divisées en deux fractions sur une colonne de résine Amberlite CG-120. L'une de ces fractions a été soumise à la chromatographie sur papier. Ainsi, les auteurs ont séparé trois composants qui ont ultérieurement été purifiés par la

technique d'électrophorèse sur papier. Les résultats d'identification ont montré que ces composants étaient les produits du réarrangement d'Amadori : glycino-déoxy-cétose, valino-déoxy-cétose, alanino-déoxy-cétose.

BARWALD et al. (1969) ont étudié les composés carbonylés du malt touraillé. Nous savons à l'heure actuelle que ces substances se forment en grande partie par la dégradation des acides aminés en présence de composés dicarbonylés (dégradation de STRECKER) dans une des étapes des réactions de MAILLARD et que leur contribution à la formation de l'arôme caractéristique du malt est indiscutable. En utilisant la technique de chromatographie en phase gazeuse, ces auteurs ont détecté en quantité importante les composés carbonylés suivants : acetaldehyde, propionaldehyde, isobutyraldehyde, butyraldehyde, isovaleraldehyde, acétone, acétylène, méthyl-éthyle cétone. Ils ont également constaté qu'il y avait une différence considérable entre les teneurs de ces substances dans les différents types de malt.

6.2. Réactions de MAILLARD en Brasserie

Les réactions de Maillard retrouvent l'occasion de se manifester en brasserie au cours du brassage et de la cuisson du moût. Elles vont se dérouler d'une toute autre manière. Car les conditions qui se présentent à cette deuxième partie de la fabrication sont complètement différentes de celles du maltage. En malterie il s'agit de réactions en milieu solide, peu hydraté, or, il ne faut pas oublier que l'eau a un effet inhibiteur sur le déroulement des réactions de Maillard.

Nous reviendrons plus tard sur ce point.

Au cours du brassage proprement dit, par suite d'intenses dégradations enzymatiques, il se forme dans le moût, en quantité importante, des sucres réducteurs, acides aminés, peptides, polypeptides etc... Rappelons que la grande majorité des sucres réducteurs du moût ne se forme qu'au cours du brassage.

Ces substances peuvent être impliquées dans les réactions de brunissement pendant la cuisson du moût.

L'influence de l'intensité des dégradations enzymatiques au brassage sur la formation de la coloration lors de la cuisson du moût a été signalé par SCRIBAN et DUPONT, (1973).

Ils ont montré qu'une augmentation de la protéolyse, naturelle ou artificielle (par exemple à l'aide de la papaïne) avait pour résultat d'une augmentation sensible de la couleur du moût après la cuisson.

Dans la littérature, le brunissement du moût pendant la cuisson a été généralement attribué à trois types de réactions :

- oxydations de polyphenols,
- réactions de caramélisation,
- réactions de Maillard.

Cependant, on ignorait l'importance relative de ces réactions dans la formation de la couleur du moût à la cuisson.

Elle a récemment fait l'objet d'études par HASHIMOTO et KOIKE, (1971). SCRIBAN et DUPONT, (1973) ont également étudié cette question d'une manière systématique. Ils ont démontré le rôle réduit des polyphenols sur la formation de la couleur du moût à l'ébullition en effectuant des essais sur un moût modèle contenant des polyphenols

du malt, ou sur un moût conventionnel aéré fortement au cours d'ébullition (ainsi l'oxydation des polyphénols serait favorisée).

Les réactions de caramélisation peuvent avoir une certaine influence sur le brunissement du moût : en effet, une solution modèle contenant 40 g/l de maltose et 10 g/l de glucose dans un tampon phosphate donne une couleur de 1,2 unité EBC au test de surcoloration (SCRIBAN et DUPONT, 1973).

D'après HASHIMOTO et KOIKE, (1971) le brunissement du moût pendant la cuisson est dû principalement aux réactions de Maillard. Un moût modèle contenant les oses principaux d'un moût conventionnel en quantité équivalente et du glyocolle comme représentant des acides aminés, donnait une coloration considérable à l'ébullition.

Par chromatographie sur couche mince, ces auteurs ont également détecté pour la première fois dans le moût, le 3-déoxy-D-glucosone, intermédiaire important de réactions de Maillard, sous la forme dinitrophenylhydrazone. Après avoir mis au point une méthode colométrique de détermination de cette substance, ils ont étudié son évolution tout au long du brassage et la cuisson. Les résultats ont montré que la concentration du 3-déoxy-D-glucosone augmentait en fonction de la température dès le brassage et continuait d'augmenter pendant la cuisson.

D'autre part, SIEFKER et POLLOCK. (1956) avaient déjà mis en évidence la formation d'aldehydes à cette étape de la fabrication.

La diminution significative des teneurs en acides aminés basiques au cours du houblonnage a été observée par SANDEGREN et al., (1954) et JONES et PIERCE, (1967) n'a pas été confirmée dans les travaux de SCRIBAN et DUPONT, (1973).

A ce sujet, ces derniers auteurs attirent l'attention sur la reproductibilité d'un doseur d'acides aminés. En tenant compte de travaux de PETIT, (1959), ils émettent l'hypothèse suivante :

Le moût est un milieu liquide, relativement dilué avec une nette prédominance de sucres réducteurs (environ 50 g/l) par rapport aux acides aminés (1 à 3 g/l). Il n'est pas traité très longtemps à l'ébullition : le moût est de ce fait moins favorable au déroulement des réactions de Maillard proprement dites, jusqu'à leurs termes ultimes. Il est possible que la réaction principale, mais non exclusive, à la cuisson du moût, soit le brunissement des sucres, réaction catalysée par les acides aminés qui ne sont pas engagés définitivement dans la réaction.

Les acides aminés jouent alors le rôle d'accélérateur de brunissement des sucres.

Par contre, les travaux très récents de HASHIMOTO, (1973) montrent bien l'engagement des acides aminés avec les oses au cours de l'ébullition du moût. Cet auteur a observé une diminution des teneurs en acides aminés et sucres réducteurs du moût à la cuisson. Les taux de diminution étaient de l'ordre de 0,23 - 1,56 mM/l pour les acides aminés et 5,3 - 7,2 mM/l pour les sucres.

6.3. Répercussions technologiques des réactions de MAILLARD en Malterie-Brasserie.

- Réactions de MAILLARD et la couleur

La contribution importante des mélanoidines à la couleur du malt, du moût et de la bière, est connue depuis très longtemps.

Comme nous l'avons vu, les mélanoidines sont des pigments

bruns constituant produits finaux des réactions de Maillard par suite d'une série de polymérisations.

Plusieurs travaux ont été réalisés en vue d'élucider les mécanismes et les intermédiaires de la formation des mélanoidines. Par contre, nos connaissances sont très limitées à propos de la structure et des propriétés qui nous permettraient de mieux comprendre leurs répercussions sur le plan technologique.

Les mélanoidines sont des substances azotées, de poids moléculaire très dispersé. Leurs propriétés varient considérablement selon leurs conditions de formation et les substances initiales mises en jeu.

Les premières études (ENDERS et THEIS, 1938 ; TAN et al., 1950, cf. REYNOLDS, 1963) sur les mélanoidines formées par la réaction d'un aldose avec un acide aminé dans les systèmes modèles ont fait ressortir les points suivants :

Insolubles dans les solvants organiques, certains d'entre eux sont très solubles dans l'eau alors que certains autres ne le sont que très peu. Les pigments solubles ont été isolés par dialyse, le rapport entre la fraction non-dialysable et la fraction dialysable s'accroît avec la progression des réactions.

Les plus grandes difficultés d'étude de mélanoidines provenaient des problèmes de purification.

Ces problèmes sont en partie résolus après l'introduction de la technique de filtration sur gel. REYNOLDS, (1963), pour la première fois, a isolé les pigments bruns par la filtration sur une colonne de Séphadex G-25.

Très récemment, CLARK et TANNEBAUM (1970), ont mis au point une méthode d'isolement et de purification de mélanoidines formés par

la réaction d'une protéine (caséine) avec un sucre réducteur (glucose) et dans le lait en poudre.

Les pigments bruns liés à la protéine ont été isolés par précipitations au point isoélectrique, suivie d'une hydrolyse enzymatique à l'aide d'un complexe d'enzymes protéolytiques (pronase). Les pigments ainsi isolés ont été purifiés par filtration sur une colonne de Biogel P-4. La fraction contenant des substances de poids moléculaire 1500 a été ultérieurement purifiée sur colonne échangeuse d'ions de carboxyméthylcellulose (CMC). L'autre fraction contenant des pigments de poids moléculaire plus élevé n'a pas pu être purifiée sur CMC. Elle a été passée sur une colonne de Biogel P-10 pour examiner la dispersion des poids moléculaires.

Les auteurs ont ensuite étudié les diverses propriétés de ces pigments : la plus grande partie des pigments était liée à la protéine. La solution tampon après la précipitation ne contenait qu'au moins de 5 % de la couleur totale du système modèle, dans le cas du lait en poudre, ce chiffre était un peu plus élevé, 10-25 %. Les fractions les plus purifiées contenaient encore des fragments de peptides. Le poids moléculaire des pigments s'accroissait en fonction de la durée et de la température de la réaction. Les pigments donnaient une réaction positive au permanganate de potassium. Les résultats d'analyses élémentaires et d'acides aminés n'étaient pas concluants.

Les mélanoidines formées par la réaction entre le D xylose et la glycine ont été fractionnées par la technique de filtration sur une colonne de Séphadex G-25, G-75, G-100 et LH-20 et les fractions obtenues ont été étudiées d'après leur volume d'élution par KATO et al., (1971). Ils ont montré que l'intensité de coloration, la teneur en réductones et le rapport C/N dans les mélanoidines augmentaient en

fonction de leur degré de polymérisation. Cependant, à partir d'un certain degré de polymérisation, ces critères devenaient constants.

Les mélanoidines préparées par l'ébullition d'une solution tamponnée de pH 4,2, contenant du maltose, glucose, xylose et du glyocolle ont été fractionnées par HASHIMOTO (1972), en deux fractions de poids moléculaires différents par ultrafiltration sur membrane Diaflo DM-2. La fraction de faible poids moléculaire (inférieure à 1000) constitue 52 % de la couleur totale. L'activité du brunissement (augmentation de la D.O. des mélanoidines à 430 nm après 4 jours de stockage à 50°C) de cette même fraction était nettement supérieure à celle de la fraction de poids moléculaire moyen (94 % contre 6 %).

MOTAI, (1973) a étudié le taux de brunissement et le ton de la coloration des solutions de mélanoidines préparées à partir de différents systèmes modèles. Le taux de brunissement a été exprimé en absorbance à 450 nm et le ton de la coloration a été estimé par le logarithme de la différence de l'absorbance (ΔA) de la solution par 100 nm entre 450 et 650 nm. D'après l'auteur, il existe une relation linéaire entre le logarithme de l'absorbance d'une solution de mélanoidines et la longueur d'onde.

La valeur ΔA est élevée pour les solutions d'un ton clair, elle diminue lorsque le ton devient sombre.

L'auteur montre tout d'abord que le taux de brunissement des solutions de mélanoidines dépend à la fois de la nature du composé aminé et de celle du sucre. Par contre, la valeur ΔA est déterminée essentiellement par la nature du composé aminé. La nature du sucre n'a aucune influence sur ce paramètre.

Les mélanoidines obtenues en présence des peptides sont généralement d'un taux de brunissement plus élevé et d'un ton plus sombre

que celles obtenues en présence des acides aminés. Cependant, la nature de peptide influence peu le ton de la solution des mélanoidines, mais le taux de brunissement présente des variations importantes selon le peptide mis en jeu. Dans le cas des acides aminés, ces deux paramètres varient considérablement d'un acide aminé à l'autre.

MOTAI, (1973) a ensuite fractionné les mélanoidines préparées à partir de différents systèmes modèles sur une colonne de DEAE - Cellulose par gradient de pouvoir éluant de 8 solutions de tampon acétate contenant de 0 à 0,40 M de NaCl.

Il a constaté que le taux relatif de brunissement de différentes fractions obtenues variaient selon la composition du système modèle. Alors que la valeur ΔA de chaque fraction, sauf la fraction éluee par le tampon seul (P 1), était semblable dans les différents types de mélanoidines.

L'auteur conclut enfin que les mélanoidines se composent de différentes substances colorées ayant des tons intrinsèques de brun-jaunâtre à brun foncé et leur ton global se détermine d'une part, par la quantité relative de différentes fractions et d'autre part, par le ton de la fraction P 1.

Dans une publication ultérieure, MOTAI et INOUE, (1974) étudient les propriétés de 8 composants de mélanoidines préparées par le chauffage d'une solution aqueuse de glyocolle-xylose à 100° pendant 2 heures et fractionnées sur une colonne de DEAE-Cellulose.

Ils présument que les composants ayant le volume d'élution faible se convertissent à des composants de volume d'élution élevé, de ton plus foncé (ΔA plus faible) et d'une coloration plus intense ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$ à 450 nm plus élevé) par une polymérisation oxydative. D'après les résultats d'analyses élémentaires, spectrométriques et d'acides aminés de leur hydrolysat, tous ces composants colorés auraient une

structure chimique très semblable. Ils se différencieraient uniquement par leur poids moléculaire ou par leur degré de polymérisation.

L'auteur a continué ses recherches sur les mélanoidines préparées et fractionnées par la même méthode. Dans un article publié récemment (MOTAI, 1974) il étudie les poids moléculaires de différents composants colorés en relation avec leur intensité de coloration.

Les poids moléculaires (PM) des fractions P 5, P 6, P 7 P 8, estimés par la méthode de filtration sur gel de Séphadex G-50, G-75 et G-150 en utilisant des dextrans comme substances de références, étaient respectivement 2140, 3550, 5600 et 14200. A cause des valeurs trop basses, les poids moléculaires des fractions P 1, P 2, P 3 et P 4, n'ont pu être déterminés par cette méthode.

L'intensité de coloration de ces différents composants a été exprimée en $E \frac{1\%}{1cm}$ à 450 nm à partir de leur hydrolysate.

MOTAI (1974) met tout d'abord en évidence l'existence d'une corrélation linéaire entre le coefficient de distribution (Kd) des composants de mélanoidines dans le gel et leur intensité de coloration ($\log E \frac{1\%}{1cm}$). Par conséquent, il considère qu'il existe une corrélation linéaire entre le $\log E \frac{1\%}{1cm}$ et le $\log PM$ des mélanoidines ayant un coefficient de $r = + 0,97$ et une droite de régression,

$$E \frac{1\%}{1cm} = 2,75 \times PM^{0,29}$$

Les poids moléculaires des fractions P 1, P 2, P 3 et P 4 calculés à partir de cette équation, sont respectivement 290, 360, 700 1200.

L'auteur démontre ensuite que l'équation $E \frac{1\%}{1cm} = k \times PM^\alpha$ est applicable à des mélanoidines préparées à partir de différents systèmes modèles.

La nature du sucre influence peu les valeurs k et α de cette

TABLEAU (III)

Flaveurs résultant du chauffage d'un acide aminé et d'un sucre purs, traités dans des conditions variées.⁺

Acide aminé	Flaveur décelée après traitement thermique
Alanine	Café de malt, goût de malt.
Acide aminobutyrique	Noix, sirop d'érable.
Arginine	Popcorn.
Cystine	Pâtisserie très grillée, peau de dindon grillée.
Cystéine	Goût de viande, oeuf cuit dur, corne brûlée.
Acide glutamique	Chocolat, jambon cuit, viande carbonisée, fumier de poulet, vieux bois.
Glycocolle	Bouillon de boeuf.
Isoleucine et leucine	Goût de malt, pomme, huile de lin séchée, moisi, fromage brûlé.
Lysine	Goût de pain, patate cuite au four, viande bouillie, beurre frit, pomme de terre frite brûlée, vieille pomme de terre, pomme de terre avariée, bois vert brûlé.
Méthionine	Pomme de terre bouillie, patate trop cuite, pomme de terre, poireau, raifort, chou hâché, chou trop cuit, soupe de haricot, potage au fromage, bois brûlé.
Phénylalanine	Miel, fleurs, violette, lilas, chocolat... et odeur de chien crasseux.
Proline	Farine de blé très grillée, pain cuit, champignon, oeuf brûlé.
Sérine	Sirop d'érable.
Tryptophane	Huile frite, cheveux brûlés.
Valine	Café de malt, pain, pain de seigle, chocolat sucré, pomme.

⁺ Etabli par ADRIAN (1973 a), d'après les travaux de BARNES et KAUFMAN (1947), KEENEY et DAY (1957), HERZ et SCHALLENBERGER (1960), KIELY et al. (1960), NAGAYAMA (1962), ROTHE et VOIGT (1963).

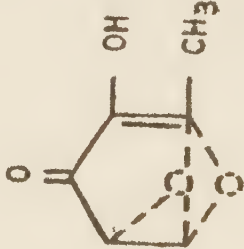
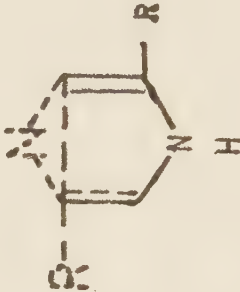
équation qui varient principalement selon le type et la taille moléculaire du composé aminé, et, c'est surtout la valeur α qui est plus intimement liée à la nature du composé aminé mis en jeu.

- Réactions de MAILLARD et la flaveur du malt du moût
et de la bière :

L'importance des réactions de Maillard dans la formation de l'arôme des produits alimentaires est actuellement reconnue par tout le monde. Aussi, en brasserie, la flaveur caractéristique du malt qui apparaît pendant le touraillage a été généralement attribuée à ces réactions. Les travaux réalisés notamment au cours de ces dernières années soulignent l'importance des réactions de Maillard sur les caractères organoleptiques de la bière, et surtout dans leur altération au cours de sa conservation.

L'éventail des flaveurs résultant des réactions de Maillard est très vaste, comme en témoigne le tableau (III) où sont rassemblés les résultats du chauffage d'un acide aminé avec un sucre réducteur dans des conditions variables. Ce tableau montre d'une manière évidente la diversité de flaveurs selon les substances mises en jeu et pour un même système selon les conditions de chauffage. Ainsi, peut-on imaginer la complexité de la formation de l'arôme dans les produits naturels où non seulement les acides aminés mais aussi d'autres protéides entrent en réaction. Par exemple, par le chauffage de caséine avec du glucose, FERRETTI et FLANAGAN, (1971) ont décelé plus de 40 substances aromatiques de nature très variée.

TABLEAU (IV) Les principaux groupes de substances aromatiques de réactions de MAILLARD

Arômes	Caramel	Popcorn Noisette Pain	Brûlé âcre empyreumatique	Variable Aldehydique Cétonique
Structures	Cyclique-énolones 	N-Hétérocyclique 	Polycarbonyls Aldehydes non-saturé ---C:O---C:O--- =C---CHO	Monocarbonyls R---CHO R---C:O---CH_3
Exemples	Cyclopentelones Cyclohexenolones Furenolones Pyrones	Pyrazines Pyrroles Pyrrolines	Glyoxal Pyruvaldehyde Diacetyl Dialdehyde-mesoxalique Acroléine Crotonaldehyde	Isobutyraldéhyde Isovaleraldehyde Méthional Furaldehydes Pyrrolaldehyde C3-C6-Méthylcétones

Les précurseurs d'arômes des réactions de Maillard sont assez bien définis. Il s'agit des composés formés au cours du réarrangement d'Amadori, du type 1-amino 1-déoxy 2-cétose (HODGE, 1953, MILLS et al., 1969).

Ensuite, les substances aromatiques résultent des opérations de déshydratation qui surviennent et donnent naissance soit à des furfurals et déhydrofurfurals, soit à des réductones et déhydroréductones. Ces derniers réagissant avec des acides aminés au cours de la dégradation de STRECKER vont engendrer les arômes spécifiques de la réaction de Maillard en aboutissant à l'apparition d'aldehydes issues de la décarboxylation d'acides aminés (HODGE, 1967).

Nous donnons dans le tableau (IV) les principaux groupes de substances aromatiques de réactions de Maillard.

Le développement des techniques de chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse a rendu possible la détection, l'identification et la détermination des substances aromatiques.

Et, depuis, un très grand nombre de travaux ont été réalisés sur les flaveurs formés au cours d'un traitement thermique de divers produits alimentaires. Une revue vient d'être publiée par ADRIAN (1973 a) à ce sujet.

DAMM et KRINGSTAD (1964) ont été les premiers à étudier les composés carbonylés de l'orge et de différents types de malt.

Ils ont isolé les composés carbonylés volatils par entraînement au CO_2 à partir d'une suspension de mouture fine, suivie d'une précipitation dans une solution de 2-4 dinitrophenylhydrazine.

Les 2-4 dinitrophenylhydrazones des composés carbonylés ainsi obtenus ont été lavés au HCl, séchés à 80°C et ils ont été pesés.

Les résultats ont révélé l'absence de composés carbonylés volatils dans l'orge et dans le malt vert. Le malt pâle en contenait

de l'ordre de 5 mg par 300 g de mouture. Par contre, à partir de la même quantité de malt foncé, les auteurs ont pu isoler environ 58 mg de dérivés 2-4 dinitrophenylhydrazones. Le malt caramel était encore plus riche en ces substances (193 mg), alors que le malt torréfié en contenait beaucoup moins, environ 24 mg de substance ont été isolés à partir de 300 g de mouture. Cela est dû probablement à la température trop élevée à laquelle le malt a été soumis pendant la torréfaction.

Les auteurs ont ensuite séparé les différents constituants de ces 2-4 dinitrophenylhydrazones par la chromatographie sur couche mince de silicagel et parmi eux, ils ont pu identifier l'acétaldehyde, le propionaldehyde, l'isovaleraldehyde, l'isobutyraldehyde et l'acétone par la chromatographie en phase gazeuse.

Les composés carbonylés moins ou non volatils ont été isolés à partir du filtrat de la suspension de mouture fine par extraction à l'éther diétylique et suivie d'une précipitation dans une solution de 2-4 dinitrophenylhydrazine.

La quantité de 2-4 dinitrophenylhydrazones isolée à partir de l'orge, du malt vert et du malt pâle était pratiquement la même, de l'ordre de 11-12 mg. Les valeurs plus élevées ont été trouvées dans le cas des malts traités à une chaleur plus intense.

BARWALD et al., (1969) ont étudié les substances aromatiques volatiles de l'orge et du malt. A cet effet la mouture de l'orge ou de malt a été extraite dans une colonne d'extraction à 60°C par de l'azote. L'azote chargé de matières aromatiques a été conduit dans des pièges refroidis. Les condensats ainsi obtenus ont été analysés en chromatographie en phase gazeuse par la technique du headspace en utilisant des détecteurs à ionisation de flamme et à capture d'électrons

et les composés suivants ont été identifiés : acétaldehyde, propionaldehyde, butyraldehyde, valeraldehyde, isobutyraldehyde, isovaleraldehyde, acétone, diacétyle, alcool éthylique, méthyl mercaptan, éthyl mercaptan, sulfure diméthylique, sulfure diéthylique et disulfure diméthylique .

Du point de vue qualitatif, ces auteurs n'ont pas constaté une différence notable entre les substances aromatiques de l'orge et celle du malt. Cependant , la teneur des composés carbonylés était beaucoup plus élevée dans le malt touraillé. Les travaux plus récents de WAGNER (1971) confirment ces résultats.

Par contre, les observations de ARKIMA et RONKAINEN (1971) sont en accord avec celles de DAMM et KRINGSTAD (1964), en ce qui concerne l'absence de composés carbonylés volatils dans l'orge. Les analyses, effectuées par la technique de chromatographie en phase gazeuse du headspace d'une pâte préparée avec la mouture de l'orge ou du malt, et équilibré à 40°C, ont montré que dans le malt, les principaux composés carbonylés étaient constitués par le propionaldehyde, isobutyraldehyde et isovaleraldehyde. Les teneurs étaient plus faibles en acétaldehyde, butyraldehyde, valeraldehyde et en furfural.

Parmi les différents types de malt étudiés, les valeurs plus élevées ont été obtenues dans les malts foncés du type Vienne, Munich et caramel, exception faite toutefois dans le cas du malt torréfié.

Par ailleurs, les auteurs ont pu identifier certains dicétones volatils entre autres, le diacétyle et le 2-3 pentanedione dans de différents types de malt.

Une étude intéressante a été réalisée par COLLINS (1971) sur les composants aromatiques de l'orge torréfié, entraînaibles à la vapeur. Cet auteur a identifié par chromatographie en phase gazeuse à

détecteur d'ionisation de flamme et de capture d'électrons, les composants suivants :

Dans le headspace : propanal, 2-méthylpropanal, 2-méthylbutanal, 3-méthylbutanal, pentanal, hexanal, furfural, propanone, butanone, 2-3 butane-di-one, 2-3-pentane-di-one, éthanol, pentanol.

Dans la fraction basique : pyridine, pyrazine, méthylpyrazine, 2-5-méthylpyrazine, 2-éthyl-5-méthylpyrazine, 2-5-diméthyl-3-éthylpyrazine, 3-5-diméthyl 2-éthylpyrazine, 2-3-diméthylpyrazine, triméthylpyrazine, 2-éthyl-3-méthylpyrazine.

La formation des composés carbonylés issus des réactions de Maillard dans le moût pendant l'ébullition a été étudié pour la première fois par SIEFKER et POLLOCK (1956). L'isolement des composés carbonylés a été effectué par distillation et le distillat a été recueilli dans une solution de 2-4 dinitrophenylhydrazine. Par la technique de chromatographie sur papier, les auteurs ont identifié les dérivés 2-4 dinitrophenylhydrazones de furfural, formaldéhyde, acétaldéhyde, butyraldéhyde, valéraldéhyde, pyruvaldéhyde, glyoxal et de hydroxyméthyl furfural.

BAVISOTTO et ROCH (1959 et 1960) ont utilisé la technique de chromatographie en phase gazeuse pour l'étude des composés volatils du moût dans les différents stades de la fabrication. Ils ont identifié un certain nombre de composés carbonylés et discuté leur variation au cours du brassage, de l'ébullition et de la fermentation.

L'importance des réactions de Maillard sur la formation de substances aromatiques du moût pendant l'ébullition a été très récemment démontrée par les travaux de TRESSL et al., (1974).

Ces auteurs ont pu identifier un très grand nombre de composés aromatiques dans le moût par la technique de chromatographie en

phase gazeuse combinée à la spectrométrie de masse. Les composés aromatiques ont été extraits à partir d'un moût dans un mélange de pentane-éther à pH 10. Cet extrait contenait les composés basiques, neutres et légèrement acides.

Parmi les composés isolés et identifiés, la plus grande partie provenait des réactions de Maillard. Ainsi, les auteurs ont montré pour la première fois l'existence dans le moût des composés hétérocycliques entre autres les dérivés furanes, pyrones, pyrazines, pyrroles etc...

Tous ces composés volatils ou non volatils passent dans la bière. Certains d'entre eux peuvent subir des modifications lors de la fermentation et avec d'autres composés phenoliques et les produits de métabolisme de la levure, ils caractérisent la flaveur globale de la bière.

Les répercussions des réactions de Maillard en brasserie ont été considérées pendant longtemps comme très favorables aux diverses qualités entre autres, la stabilité colloïdale et la stabilité organoleptique de la bière.

Cependant les travaux intenses effectués notamment au cours de ces dernières années sur l'altération du goût de la bière pendant la conservation ont révélé la part importante de ces réactions dans la formation des composés responsables du goût oxydé de la bière.

Plusieurs auteurs ont trouvé un parallélisme entre le développement du goût oxydé et l'augmentation de la teneur en composés carbonylés volatils de la bière au cours du stockage. C'est pourquoi, ces composés ont été considérés comme les principaux responsables de l'altération du goût.

La formation des composés carbonylés dans la bière au cours du stockage, peut avoir lieu par des mécanismes divers. A l'état actuel de nos connaissances, il existe trois mécanismes possibles. Ce sont :

- (1) autoxydation des acides gras,
- (2) oxydation des alcools supérieurs par les mélanoidines ou par les polyphenols oxydés (quinones) agissant comme accepteurs d'électrons,
- (3) la dégradation de Strecker des acides aminés en présence de composés *alpha*-dicarbonylés (MEILGAARD, 1972 ; LINDSAY, 1973 ; DEVREUX, 1973).

Le mécanisme de formation des aldehydes volatiles par l'oxydation des alcools supérieurs de la bière, grâce aux mélanoidines, a été proposé par HASHIMOTO (1972), qui a étudié d'une manière systématique l'altération du goût de la bière pendant la conservation.

Après avoir confirmé l'accumulation considérable des aldehydes volatiles dans la bière conservée en bouteilles à 50°C, l'auteur montre l'influence minime ou nulle des acides aminés et des acides gras sur la formation de ces substances dans ces conditions de stockage. D'après lui, les précurseurs exclusifs du goût oxydé de la bière seraient les alcools supérieurs.

En effet, le moût saturé en CO₂ et conservé en bouteilles, ne voit pas sa teneur en aldehydes augmenter, alors qu'il contient des acides aminés, des composés dicarbonylés, des mélanoidines et des lipides, etc... Par contre, l'addition d'alcools supérieurs conduit immédiatement à une augmentation de la teneur en aldehydes volatiles.

HASHIMOTO (1972) constate ensuite que l'oxygène moléculaire seul, ne cause pas d'oxydation des alcools supérieurs en aldehydes dans les conditions de conservation. A partir de ces points, il émet l'hypothèse de l'existence dans la bière d'un groupe de substances agissant comme accepteurs d'électrons, qui oxyderaient les alcools supérieurs. D'autre part, dans une publication précédente (HASHIMOTO et KOIKE, 1971) les auteurs avaient signalé que le brunissement de la bière au cours du stockage en bouteilles, dû à la transformation des mélanoidines de faible poids moléculaire en pigments plus colorés de poids moléculaire plus élevé, était accompagné d'une augmentation de la teneur en aldehydes. Par conséquent, il se propose d'étudier s'il y a une liaison entre ces deux phénomènes, en d'autres termes, si les mélanoidines qui se transforment au cours de stockage, jouent également un rôle dans la formation des aldehydes volatiles.

L'auteur a par la suite démontré par une série d'expérimentations, le rôle des mélanoidines sur ce phénomène.

Par élimination préalable des mélanoidines de la bière par le charbon actif, il n'a pas observé une formation d'aldehydes au cours de la conservation. L'addition des mélanoidines synthétiques dans la bière décolorée de la même façon, donnait naissance à des aldehydes autant que dans la bière témoin, au cours d'essai de stockage. D'autre part, par incubation des alcools supérieurs extraits de la bière avec les mélanoidines synthétiques, il se formait également des aldehydes volatiles.

L'auteur a ensuite montré que ce phénomène n'exigait pas la présence d'oxygène moléculaire mais il s'accélérait dans des conditions aérobiques. L'augmentation de la température de stockage et la diminution du pH favorisaient également la formation d'aldehydes.

HASHIMOTO (1972) étudie par la suite l'activité alcool-oxydant des mélanoidines synthétiques, exprimée en quantité d'aldéhyde formée par incubation dans une solution d'éthanol (5 % v/v) à 50°C pendant 4 jours.

Au cours du chauffage d'un système modèle de sucres - acides aminés, cette activité augmente régulièrement en fonction du temps, alors qu'elle reste pratiquement inchangée pendant le stockage à 50°C.

L'étude de fractionnement des mélanoidines synthétiques par ultrafiltration sur membrane a révélé que l'activité alcool-oxydant se trouvait essentiellement dans la fraction de poids moléculaire inférieure à 1000. Cette fraction possédait également la grande partie des groupements carbonylés réactifs et des groupements énedioliques.

En conclusion, l'auteur propose un schéma de mécanisme de l'oxydation des alcools supérieurs en présence des mélanoidines, selon lequel, les électrons des alcools supérieurs seraient transférés aux groupements carbonylés réactifs des mélanoidines de faible poids moléculaire.

Dans une publication ultérieure, HASHIMOTO (1973) donne les détails de ses investigations sur l'influence de différents facteurs dans l'activité alcool-oxydant des mélanoidines synthétiques.

La nature et la concentration des composants initiaux jouent un rôle important sur cette activité. Parmi les acides aminés, ce sont les acides et neutres qui donnent les activités les plus élevées. Le maltose, le fructose et le glucose sont les plus importants sucres qui sont impliqués aussi bien dans la formation de la couleur que dans la formation de l'activité alcool-oxydant. Cette activité augmente en fonction de la concentration de l'acide aminé,

mais elle diminue lorsque la concentration du sucre augmente.

La conséquence pratique de cette observation est que l'activité alcool-oxydant d'un moût à l'ébullition passe par un maxima en fonction de sa concentration. Ce maxima se situe au niveau de 15° Plato.

HASHIMOTO (1973) montre enfin que l'augmentation du pH et la présence des phosphates et des ions ferriques et cupriques favorisent le développement de cette activité au cours de l'ébullition du moût.

L'hypothèse de la formation des aldehydes dans la bière par la voie de réaction de Strecker a été émise par BLOCKMANS et DUJARDIN (1973).

En ajoutant 40 ppm d'isobutanol dans une solution de mélanoidines, ces auteurs n'ont observé aucune présence d'isobutyraldehyde après 6 jours d'agitation en présence d'air. De même, en remplaçant la solution de mélanoidines par la bière, il n'est apparu aucune différence entre les bières oxydées avec et sans apport d'isobutanol.

N'ayant pu confirmé dans ces conditions, l'hypothèse d'HASHIMOTO, ils se proposent de vérifier la possibilité de la formation des aldehydes par la réaction de Strecker.

Les essais ont révélé que la bière additionnée de la valine, agitée pendant 4 jours en présence d'air, voyait sa teneur en isobutyraldehyde, augmenter considérablement par rapport à la bière témoin traitée de la même façon sans apport de la valine.

BLOCKMANS et al. (1975) ont confirmé ces résultats dans le cas d'autres acides aminés. Ils ont observé l'apparition d'aldehyde correspondant à l'acide aminé mis en jeu.

- Réactions de MAILLARD et les phénomènes d'oxydation
en brasserie

On sait depuis longtemps que les substances réductrices formées au touraillage du malt et à la cuisson du moût par la voie des réactions de Maillard peuvent jouer un rôle protecteur contre les méfaits bien connus de l'oxydation en brasserie.

DE CLERCK et VAN CAUWENBERGE (1956) ont été les premiers à réaliser une étude très détaillée sur les substances réductrices de la bière. Par la méthode de détermination mise au point, ces auteurs ont constaté l'existence de trois types de réducteurs dans la bière d'après leurs réactivités avec le 2-6-dichlorophenol indo-phenol (DPI) : réducteurs immédiats, rapides et lents. Les deux premiers groupes comprennent essentiellement les réductones et les mélanoïdines. Le troisième groupe renferme surtout les polyphenols. Cependant les frontières entre ces trois types ne sont pas très précises. D'autre part, les auteurs ont également montré qu'une solution chauffée d'un acide aminé et d'un sucre contenait ces trois types de réducteurs.

En effet, à la lumière de nos connaissances sur le mécanisme des réactions de Maillard, on peut distinguer trois types de groupement ayant des propriétés réductrices. Ces groupements sont dans l'ordre de leur réactivité vis-à-vis du DPI : les ènediols ($-C(OH)=C(OH)-$), les èneaminols ($-C(OH)=C(NH_2)-$) et les ènediamines ($-C(NH_2)=C(NH_2)-$) (REICH et BOCK 1960).

On trouve ces groupements réducteurs dans de diverses étapes des réactions de Maillard. La forme 1-2-ènolique des produits de réarrangement d'Amadori qui sont considérés comme important intermé-

diaires dans la formation du 3-déoxyosone (KATO 1963), contient le groupement 1-2-éneaminol qui réduit le DPI en milieu faiblement acide (KATO et al. 1968).

La réactivité des produits de réarrangement d'Amadori avec les indicateurs rédox a été signalée par plusieurs auteurs (cf. HODGE 1955). Ces composés réagissent entre autres avec le DPI, Bleu de méthylène, ferricyanure et *o*-dinitro-benzène, en milieu alcalin. D'après ce même auteur, ce dernier réactif peut être utilisé pour distinguer dans un milieu réactionnel les réductones et les produits de réarrangements d'Amadori. Les premiers réagissent immédiatement en donnant une coloration pourpre alors que les seconds ne donnent une réaction qu'environ une minute après le mélange avec cet indicateur.

La dégradation des amino-cétoses par la voie de la 2-3-énolisation peut avoir lieu notamment dans le cas des amines secondaires (HODGE et al. 1963). Cette voie conduit à la formation des substances ayant la même structure énediolique : comme les réductones et les aminoréductones. Le mécanisme de la formation de ces substances a été élucidé notamment par les travaux de SIMON et HEUBACH (1965).

Les aminocétoses ou les aminoaldoses peuvent se condenser avec une autre molécule d'une amine. KITAOKA et ONODERA (1962) ont montré la formation d'un énediamine par la dégradation oxydative de 1-déoxy-1-toluidino-fructose. Cet énediamine se décompose ensuite en donnant une molécule d'arabonamide et une molécule de N-p-tolylformamide.

Les substances réductrices que nous venons de voir se trouvent non seulement comme produits intermédiaires dans un milieu réactionnel, mais elles peuvent être également incluses dans les molécules de mélanoidines proprement dite. En effet, plusieurs auteurs ont

signalé que les produits bruns polymérisés des réactions de Maillard, donnaient une réaction positive avec le réactif de Tillman (ENDERS 1943, DIEMAIR et LOTZBEYER 1949, HODGE 1953, KATO et al. 1968).

KATO et al. (1968) ont fait une étude quantitative sur les groupements réducteurs des mélanoidines préparées à partir des différents systèmes modèles et purifiées par la technique de dialyse. Les dosages effectués selon la méthode de MITSUDA et SHIKANAI (1957) ont montré que le taux de groupements réducteurs (essentiellement les ène-diols et les ène-aminols) des mélanoidines purifiées, variaient fortement selon la nature des composants initiaux, alors que l'intensité de coloration de ces mélanoidines ne présentaient pas des variations pour autant. Cependant, pour les mélanoidines préparées à partir d'un même système modèle, il paraît exister une certaine relation entre l'intensité de coloration et la teneur en réducteurs d'une part, et leur degré de polymérisation d'autre part.

KATO et al. (1971) ont fractionné les mélanoidines préparées à partir d'un système de xylose-glycine ou *n*-butylamine par la technique de tamisage moléculaire sur divers Séphadex, et ils ont montré que l'intensité de coloration et la teneur en réducteurs augmentaient en fonction de la taille moléculaire des mélanoidines.

L'action inhibitrice des produits des réactions de Maillard sur l'autoxydation de lipides a été signalé pour la première fois par FRANZKE et IWAINSKY (1954). Ensuite, YAMAGUCHI et al. (1964 et 1967) ont constaté le rôle favorable des produits formés au cours des réactions de Maillard sur la stabilité des lipides contenues dans des produits biscuitiers et ils ont suggéré que les substances réductrices comme les réductones étaient essentiellement responsables de cet effet antioxydant.

Cependant, les travaux de KIRIGAYA et al. (1968) n'ont pas

confirmé le rôle des réductones formés au cours de la réaction entre xylose et glycolle dans l'activité antioxydante du milieu réactionnel sur l'acide linoléique. Ces auteurs ont constaté que l'activité antioxydante, déterminée par le dosage des peroxydes formés par l'autoxydation de l'acide linoléique, l'intensité de coloration ainsi que le taux de réductones augmentaient en fonction de la durée du chauffage. Par contre, lors du stockage à 4°C de ce mélange chauffé à 100°C pendant 9 heures, bien que le taux de réductones diminue régulièrement, l'activité antioxydante et l'intensité de coloration restaient pratiquement inchangées.

En outre, l'oxydation préalable des réductones par le DPI, ne modifiait guère l'activité antioxydante du mélange réactionnel.

Les auteurs ont ensuite dialysé ce mélange brun. Le dialysat et l'adialysat ont été ramenés au même taux de réductones par dilution et leurs activités antioxydantes ont été déterminées. Les résultats ont montré que le dialysat qui a une coloration intense, était environ quatre fois plus actif que l'adialysat qui est très peu coloré.

YAMAGUCHI et FUJIMAKI (1973) ont fractionné les produits des réactions de Maillard (obtenus par le chauffage d'une solution xylose-et glycine) sur une colonne de Séphadex G-15, et ils ont étudié la distribution de l'activité antioxydante dans les différentes fractions. Les résultats ont montré que l'activité antioxydante des fractions contenant les substances de poids moléculaire élevé était nettement supérieure à celle des fractions de faible poids moléculaire, qui contiennent notamment les produits intermédiaires entre autres, les réductones. Ainsi le mécanisme de l'action antioxydante des produits des réactions de Maillard ne peut être attribuée aux groupements énedioliques qu'ils contiennent, mais ils doivent manifester leur action par un autre mécanisme inconnu.

Citons encore à ce sujet le dernier article de KATO et al. (1975) qui ont étudié l'influence de l'oxydation et de la réduction sur l'activité antioxydante des mélanoidines préparées par la dialyse d'une solution chauffée de glucose-glycocolle.

Par oxydation au permanganate de potassium, les mélanoidines se dégradent et leur couleur s'estompe presque complètement. Cependant, la fraction soluble dans le butanol des produits d'oxydation montre une activité antioxydante comparable à celle des mélanoidines avant l'oxydation. Ce qui indique que les groupements responsables de l'activité antioxydante ne sont pas modifiés pendant l'oxydation. Par contre, lorsqu'on réduit les mélanoidines à l'aide du borhydride de sodium, la décoloration est accompagnée d'une forte diminution de l'activité antioxydante.

1.2. REACTIONS DE CAMELISATION

1.2.1. Définition

Les réactions de caramélisation sont un autre type de brunissement non-enzymatique rencontrées dans l'industrie alimentaire qui impliquent la dégradation thermique des oses en absence des protides.

On désigne sous le nom de caramel, le produit brun noir formé par chauffage des sucres à une température bien supérieure à leur point de fusion. Il trouve de multiples applications comme colorant, même parfois comme aromatisant dans de nombreux secteurs de l'industrie alimentaire.

En outre, le caramel se trouve à l'état naturel dans la plupart des produits alimentaires, riches en substances hydrocarbonées, soumis à une cuisson ou un traitement thermique énergique. En effet, sous l'effet d'une chaleur intense, les sucres et les autres matières hydrocarbonées subissent une décomposition partielle avec formation de dérivés caramélisés, qui confèrent aux produits, une flaveur

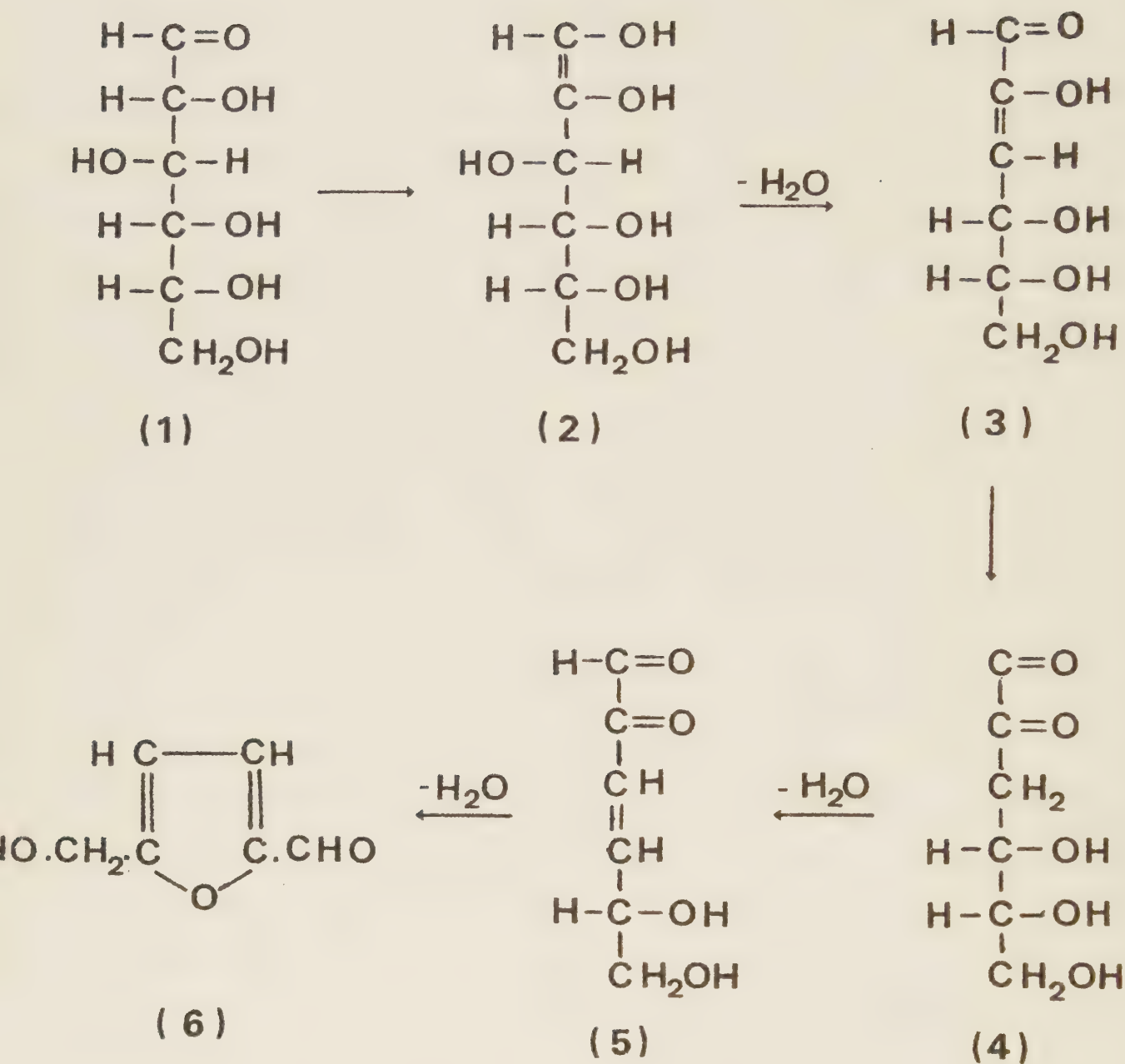


FIGURE 9 Mécanisme de la dégradation des oses en présence d'acide
(D'après GREENSHIELDS et MAC GILLIVRAY, 1972)

particulière caractéristique et une coloration brune plus ou moins intense. C'est le cas de la croûte du pain, du café grillé, des articles de confiserie et de certains types de malt, etc...

La dégradation thermique des oses en absence des protides se produit à des températures très élevées, alors que dans ces conditions alcalines ou acides, elle peut avoir lieu à une température moins élevée.

Les études concernant ces réactions ont été peu nombreuses en égard à leur complexité. Néanmoins, dans un certain nombre de travaux de synthèse, les auteurs ont essayé de faire le point sur les divers aspects de ces réactions (HODGE, 1953, 1967 ; REYNOLDS, 1965 ; FAGERSON, 1969 ; KORT, 1970 ; GREENSHIELD et MCGILLIVRAY, 1972 et GREENSHIELD, 1973) .

Deux différents mécanismes réactionnels ont été proposés, les réactions de caramélisation en milieu acide et celles en milieu basique.

1.2.2. Réactions de caramélisation en présence d'acides

Les oses en présence d'acides se dégradent par le chauffage en donnant des furfurals, précurseurs de pigments bruns. Le mécanisme réactionnel a été établi comme suit (Fig. 9) :

Dans la première étape, par énolisation d'une molécule d'aldose (1), il se forme une molécule de 1-2 émol (2) .

La déshydratation de 1-2 émol conduit à la formation de 3-déoxyaldose-2-ène (3) . Ce dernier par un réarrangement donne une molécule de 3-déoxyosulose (4) .

Arrivé à ce stade, il se produit deux déshydratations succes-

sives (6) par l'intermédiaire de osulose-3-ène (5).

Dès lors, les réactions conduisant à la formation des pigments bruns ne sont pas encore connues.

D'après HODGE (1967) on peut constater une série de scissions dans le milieu réactionnel ainsi, il se forme des acides organiques, des produits carbonylés qui sont à l'origine de la flaveur caractéristique, puis une série de condensation et de polymérisation conduit aux pigments bruns.

La dégradation thermique des oses peut être catalysée par les acides organiques ou minéraux.

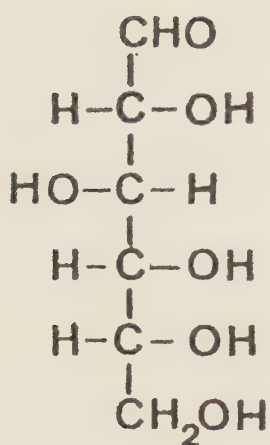
Etant donné le rôle réduit des acides minéraux dans l'industrie alimentaire, les travaux ont été consacrés notamment à l'action des divers acides organiques sur les sucres réducteurs.

LEWIS et al. (1949) ont étudié le brunissement d'une solution de glucose et citrate (0,25 M), ils ont montré que à pH 7,2 et à 90 - 110° C cette solution brunissait plus vite qu'une solution de glucose-glycine dans les mêmes conditions.

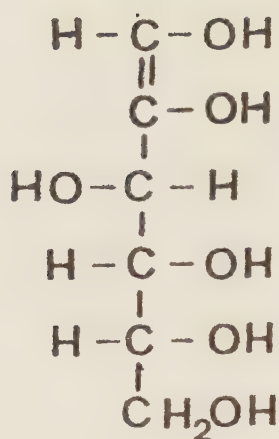
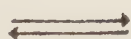
D'après PATRON (1953) le brunissement des oses en présence d'acides organiques exige des températures supérieures à 100°C.

Par exemple, la solution aqueuse de glucose contenant 0,05 M d'acide citrique ou d'acide malique ne donne pratiquement pas de brunissement à 50°C pendant 10 jours.

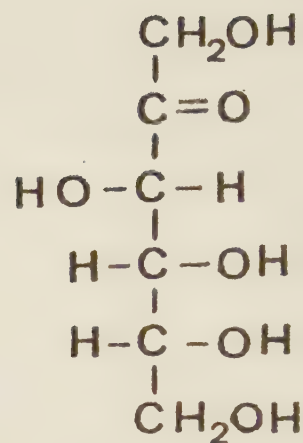
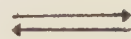
SHAW et al. (1967) ont récemment étudié la dégradation du fructose par chauffage à 100°C pendant 5 heures en présence de l'acide citrique à différents pH (1,0 ; 2,15 ; 3,5). Ils ont identifié dans le milieu les substances suivantes : 5-HMF, 2-hydroxyacétyl-furane, furfural, 5-méthyl-2-furaldehyde, isomaltol, acide formique, acide acétique, acide levulinique.



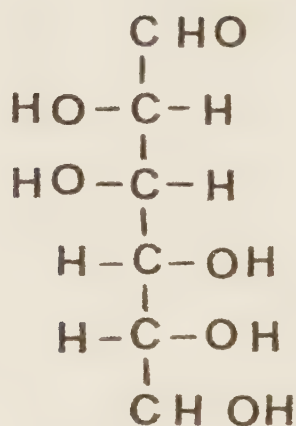
D-GLUCOSE



1,2-ENOL

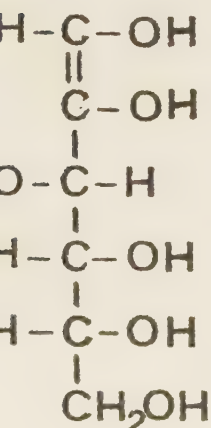


D-FRUCTOSE

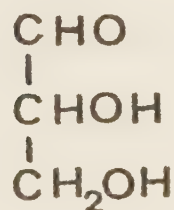


D-MANNOSE

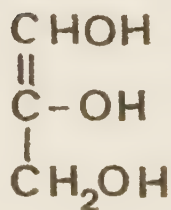
1,2-ENOL



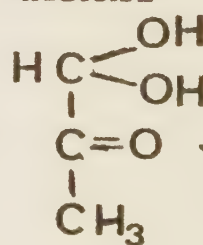
GLYCERALDEHYDE



TRIOSE
ENEDIOL



PYRUVALDE-
HYDE
HYDRATE



DL-ACID
LACTIQUE

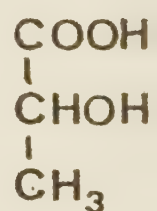


FIGURE 10 Mécanisme de la dégradation des oses en présence d'alcali. (D'après GREENSHIELDS et MAC GILLIVRAY, 1972)

KATO et al. (1969) ont fait une étude systématique sur l'effet des divers acides organiques sur la dégradation thermique du D-glucose et du D-fructose en présence et en absence du glycolle. Les solutions aqueuses des sucres à pH 5,5 ont été soumises à un chauffage de 4 heures à 100°C. L'intensité de la coloration formée, a été mesurée à 470 nm. Les résultats ont montré qu'en absence de glycine, les acides organiques sont plus efficaces sur le fructose que sur le glucose. L'intensité de brunissement du fructose était la plus forte avec l'acide acétique suivie par l'acide phosphorique, l'acide malique et l'acide citrique alors que le brunissement du glucose était influencé notamment par la présence d'acide phosphorique. L'acide citrique, l'acide malique et l'acide acétique n'avaient guère d'influence sur la dégradation de cet ose. L'acide chlorhydrique n'intervenait pratiquement pas dans le brunissement de ces 2 sucres.

Les auteurs ont également montré que la présence d'acides organiques influençait fortement le brunissement d'un système de glucose ou fructose-glycine.

1.2.3. Réaction de caramélisation en présence d'alcalis

La dégradation des oses peut avoir lieu beaucoup plus facilement en présence d'alcalis qu'en présence d'acides. C'est pourquoi, dans la production industrielle de caramel, on utilise notamment des catalyseurs alcalins.

Les réactions se déroulent comme suit (Fig. 10) :

Tout d'abord la molécule de glucose s'isomérisé en fructose par la réaction connue sous le nom de la transformation de LOBRY de BRUYN ALBERDA van EKENSTEIN.

Ensuite une série de scissions des molécules de sucres se produit.

.../...

Et finalement, les réactions de polymérisation et de condensation aboutissent à la formation de pigments bruns.

Les réactions de caramélisation que nous venons de schématiser, ne représentent que la dégradation des oses sous l'effet catalytique d'un alcali. Or, dans la fabrication du caramel, on utilise fréquemment, comme catalyseur, l'ammoniaque ou des sels d'ammonium qui en réalité, n'interviennent pas comme véritable catalyseur, puisqu'ils prennent apparemment une part active dans les réactions.

Récemment KORT (1970) a fait une étude bibliographique très détaillée sur la chimie de ces réactions en présence d'ammoniaque. Il a montré les voies possibles des formations des pyrazines, imidazoles et de nombreux autres produits.

1.2.4. Réactions de caramélisation en Malterie-Brasserie

Les réactions de caramélisation peuvent avoir lieu pendant les opérations de malterie-brasserie.

Les acides organiques, catalyseurs de ces réactions, existent dans le malt en quantité non négligeable, (300 mg/l), ce qui pourrait permettre le déroulement des réactions au cours du touraillage.

D'autre part, leur importance est accrue dans le cas de la fabrication des malt spéciaux où la température de coup de feu s'élève jusqu'à 140-150°C.

De même, pendant l'ébullition du moût, il a été expérimentalement démontré que la dégradation thermique des oses est en partie responsable de la formation de la coloration (HASHIMOTO et KOIKE, 1971 ; SCRIBAN et DUPONT, 1973, voir page 40).

2. BRUNISSEMENT ENZYMATIQUE

2.1. INTRODUCTION

Les réactions de brunissement enzymatique impliquent l'oxydation des substances phénoliques par des enzymes. C'est un phénomène bien connu qui se produit notamment dans beaucoup de tissus de fruits coupés ou blessés et dans des jus de fruit lorsqu'ils sont exposés à l'air.

Pendant le cycle vital des végétaux ces réactions peuvent survenir mais d'une manière très lente. C'est ce qu'on appelle le brunissement fonctionnel, qui n'a pas d'importance dans l'industrie alimentaire. Par contre, lorsqu'elles se produisent accidentellement au stockage, à l'emballage ou durant le processus alimentaire, leurs effets peuvent être très préjudiciables aux qualités des produits.

Depuis la première constatation faite par LINDET en 1895, dans le cidre, les brunissements oxydatifs catalysés par les enzymes ont fait l'objet d'études par un grand nombre de chercheurs.

On peut citer à titre d'exemple les très importantes revues bibliographiques de JOSLYN et PONTING (1951), MASON (1955), BRAVERMANN (1963), ESKIN et al. (1971) et de MATHEW et PARPIA, (1971).

2.2. LES SYSTEMES ENZYMATIQUES MIS EN JEU

Les plus importants systèmes enzymatiques dont le rôle est indiscutablement connu dans les réactions de brunissement sont les polyphénoloxydases (E.C.1.10.3.1.). Les peroxydases ne peuvent oxyder

les polyphénols qu'en présence de H_2O_2 (WESTERWELD et LAW 1942). Par conséquent, leur contribution aux réactions de brunissement n'est pas importante. Les catalases et les cytochrome-oxydases, d'autres types d'enzymes oxydatifs rencontrés dans les végétaux, n'interviennent pas dans l'oxydation des polyphénols.

Les enzymes catalysant des substances phénoliques par l'oxygène moléculaire, ont été désignées dans la littérature sous les noms de tyrosinases, catéchol-oxydases, laccases, phénolases, polyphénoloxydases. Cette confusion dans la nomenclature provenait de l'incertitude des connaissances dans ce domaine et de la date ancienne de leur découverte.

Récemment, la commission de l'Union Internationale des Biochimistes sur les enzymes a fait le point (FLORKIN et STOTZ, 1965). Elle les a classifiées en deux groupes

- *ortho*-diphénoloxydase (E.C.1.10.3.1.) encore dénommée catéchol-oxydase, tyrosinase, polyphénoloxydase, phénolase.
- *para*-diphénoloxydase (E.C.1.10.3.2.) connue également sous le nom de laccase.

Contenant du cuivre dans leur molécule, ces deux groupes d'enzymes se distinguent d'après leur substrat.

Les *ortho*-diphénoloxydases (polyphénoloxydases) sont actives à la fois sur les monophénols (activité crésolasique) et sur les *ortho*-diphénols (activité catécholasique) avec formation finale

d'*ortho*-quinones, alors que les *para*-diphénoloxydases (laccases) sont actives sur les *ortho*- et *para*-diphénols ainsi que sur la *p*-phénylènediamine.

La laccase a été découverte en 1883 par YOSHIDA dans le latex de l'arbre à laque où elle est responsable de brunissement à l'air du laccol. Elle a été également trouvée dans le mycélium des champignons (LINDEBERG, 1950). Mais l'existence de ces enzymes dans d'autres tissus végétaux n'a pas été signalée. Par contre, les polyphénoloxydases sont extrêmement répandues dans le règne végétal où leur rôle important sur le brunissement a été mis en évidence par un grand nombre de chercheurs.

Dans cette partie de notre exposé, avant d'étudier le mécanisme réactionnel, nous allons faire un aperçu sur les diverses propriétés des enzymes impliquées dans les réactions de brunissement notamment celles des polyphénoloxydases.

- Polyphénoloxydases

Les études sur les polyphénoloxydases ont commencé en 1895 par les travaux de BOURQUELET et BERTRAND qui ont isolé, à partir des champignons, une enzyme catalysant l'oxydation de la tyrosine (tyrosinase).

Dès lors, ces enzymes ont été beaucoup étudiées ainsi a-t-on reconnu leur présence dans un très grand nombre de tissus aussi bien végétaux qu'animaux.

Les sources utilisées fréquemment pour la préparation de polyphénoloxydase sont les champignons et la pomme de terre.

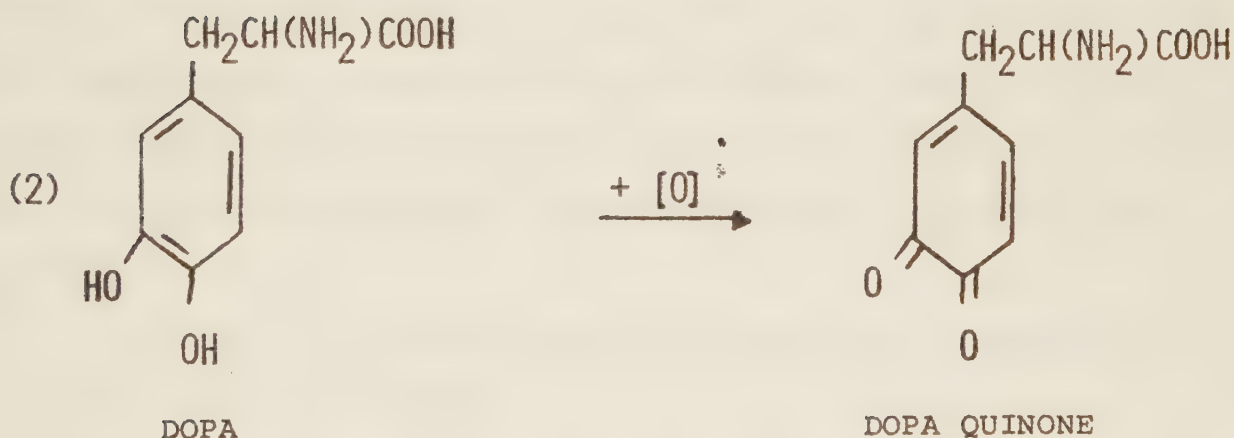
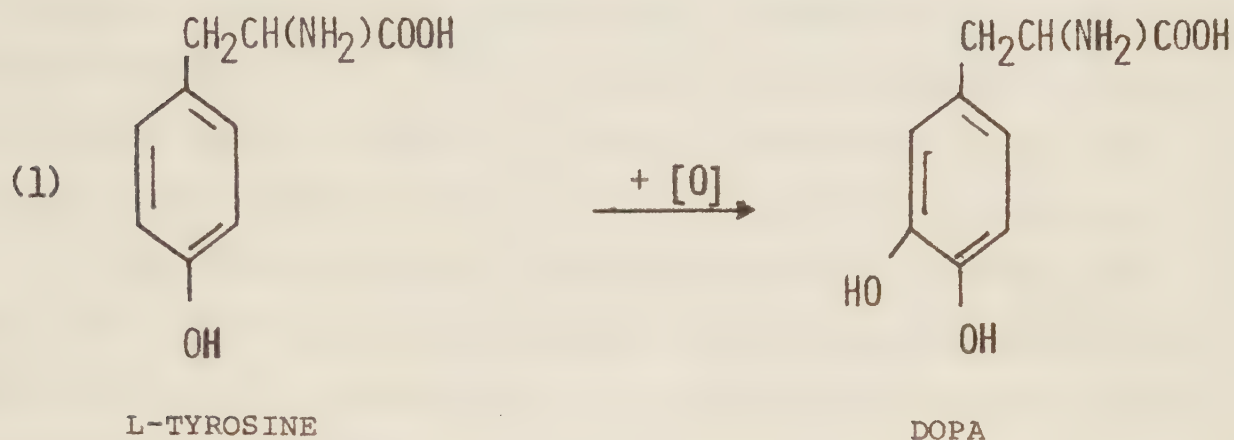
La procédure d'extraction de l'enzyme à partir de sources naturelles, consiste, dans une première étape, à l'élimination de

substances phenoliques susceptibles de s'oxyder au cours du processus. En effet, les produits d'oxydation des polyphenols en se combinant avec le groupement protéique de l'enzyme entraînent une perte considérable de l'activité (SANDERSON, 1965). A cet effet, on utilise généralement de l'acétone. Les substances interférentes ainsi éliminées, on extrait alors l'enzyme dans des solutions aqueuses de force ionique peu élevées. Dans la plupart des cas, l'extraction se fait dans de l'eau ou dans des solutions tampon diluées, de pH neutre.

Les méthodes de purification de l'extrait brut ainsi obtenu, impliquent des précipitations et solubilisations dans des solutions de tampon de pH approprié, des fractionnements par les solutions de sulfate d'ammonium, des dialyses, des séparations sur colonne d'échangeur d'ions et de gel etc... On trouvera des renseignements très détaillés sur ce sujet dans les publications dont nous citons ci-dessous quelques unes parmi les plus récentes :

- Polyphenoloxydase de pomme de terre : PATIL et ZUCKER, 1965 ;
CRAFT , 1966.
- " champignon : SMITH et KRUEGER, 1962 ;
KERTESZ et ZITO, 1965.
- " raisin : POUX, 1966 ; HAREL et MAYER
1971.
- " thé : TAKEO, 1965 ; GREGORY et
BENDALL, 1966.
- " pomme : HAREL et al., 1965 ; WALKER et
HULME, 1966.
- " tabac : LOON, 1971.

Comme nous l'avons vu, les polyphénoloxydases ont à la fois les activités crésolasique (1) et catécholasique (2) qu'on peut représenter par les équations suivantes :



Cependant, des préparations peuvent être plus ou moins riches en l'une ou l'autre de ces activités. D'une manière générale, plus on purifie l'enzyme, plus l'activité crésolasique tend à diminuer et ainsi, peut-on obtenir des préparations presque exclusivement catécholasiques.

L'oxydation des monophénols en *O*-diphénols est caractérisée par une période d'induction, notamment lorsque l'enzyme est pure. Cette période peut être réduite ou même éliminée par l'addition de l'*O*-diphénol ou par un composé réducteur tel l'acide ascorbique ou l'*O*-quinone (MASON, 1956). D'autre part, KERTESZ, (1952) signale que la conversion de la tyrosine en dopa est accélérée par les ions métalliques tels le cuivre, le cobalt, le vanadium et le nickel. Une explication satisfaisante n'a pas été donnée à ce phénomène.

Quoiqu'il en soit, l'activité catécholasique est sans doute plus importante que l'activité crésolasique dans le brunissement des produits alimentaires où la plupart des substances phénoliques sont les *O*-diphénols.

La présence de petites quantités de cuivre dans les préparations de polyphénoloxydase et son rôle important sur l'activité a été montré pour la première fois par KUBOWITZ (1937). La dialyse de l'enzyme contre cyanure qui élimine le cuivre entraîne une disparition totale de l'activité qui peut être régénérée par addition d'ions de cuivre.

Ainsi, le cuivre est considéré comme le groupement prosthétique de la polyphénoloxydase.

Les travaux de FLING et al. (1963) et de KERTESZ et ZITO (1965) ont montré que le cuivre inclus dans la molécule d'enzyme est monovalent. Cependant, ces auteurs ont également trouvé du cuivre en état cuprique dont la quantité varie de 1 à 25 % de la teneur totale en cuivre selon l'âge et le mode de préparation de l'extrait enzymatique.

On ne connaît pas encore parfaitement le rôle du cuivre inclus dans la molécule d'enzyme dans l'oxydation de polyphénols et

on admet généralement la théorie basée sur les changements de valence des atomes de cuivre dans le site catalytique de l'enzyme, proposée par MASON, (1956,1957).

D'après cette théorie, la configuration catalytique de l'enzyme ayant l'action crésolasique consiste à deux atomes de cuivre monovalent liés au groupement protéique. Ce complexe peut se combiner avec une molécule d'oxygène.

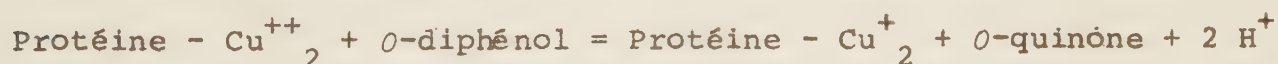


La réaction de l'hydroxylation de monophénols se déroule comme suit :

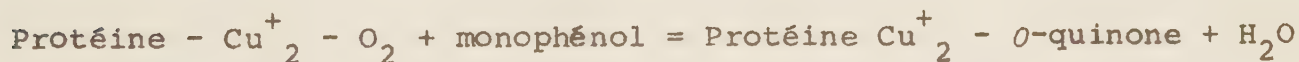


Un atome de la molécule d'oxygène est consommé dans l'hydroxylation de monophénol alors que l'autre est converti en eau.

Le cuivre monovalent donne deux électrons nécessaires pour cette réaction, en se transformant en cuivre cuprique (inactive). La réactivation se fait par oxydation de O-diphénol en O-quinone :



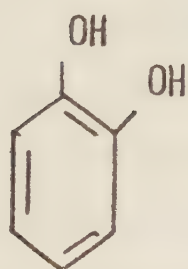
L'équation globale serait :



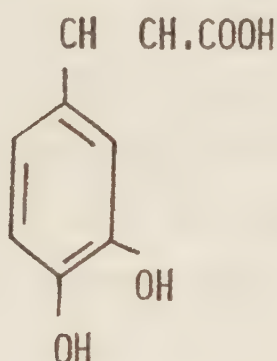
Dans l'action catécholasique, deux molécule d'O-diphénol sont oxydées en donnant deux molécules d'O-quinone, ce qui conduit à la réduction d'une molécule d'oxygène en deux molécules d'eau.

Les polyphénoloxydases peuvent intervenir dans l'oxydation d'un très grand nombre de substances phénoliques.

D'une manière générale, la configuration chimique la plus convenable pour l'action enzymatique est la structure *o*-dihydroxylique comme elle est indiquée dans les exemples suivants :



CATECHOL



ACIDE CAFEIQUE



ACIDE PROTOCATECHIQUE

Cependant, les dérivés méthyl-substitués de ces substances tel que le guaïacol, l'acide férulique ne sont pas les substrats de la polyphénoloxydase (FINKLE et NELSON, 1963).

Cet enzyme est presque sans effet sur les *m*-diphénols, certains auteurs croient même que la présence de ces substances provoque une inhibition sur l'activité enzymatique (BENDALL et GREGORY, 1963).

Néanmoins, dans le cas de *p*-diphénols par exemple le quinol, l'activité polyphenoloxydasique a été signalée (GREGG et NELSON, 1940).

Les monophénols agissant comme les substrats de l'enzyme, ne sont pas nombreux. D'après BARUAH et SWAIN (1959) parmi les monophénols testés seulement le *p*-crésol, la tyrosine et la phlorétine sont

oxydés par l'action de la polyphénoloxydase extraite de la pomme de terre.

Si le rôle des polyphénoloxydases dans le brunissement des produits alimentaires est indiscutable, son importance dans le métabolisme végétal reste encore inconnue. En dépit d'un très grand nombre d'études effectuées, nos connaissances actuelles se limitent au niveau des hypothèses émises à ce sujet.

D'après JAMES (1953) ces enzymes prennent part dans la respiration cellulaire comme une oxydase terminale. MASON (1955) de sa part, signale leur participation dans la biosynthèse de la lignine, tandis que CRAFT et AUDIA (1962) proposent qu'elles sont impliquées dans un mécanisme d'autoprotection des végétaux.

2.2. MECANISME REACTIONNEL

La première étape de réactions de brunissement enzymatique implique l'oxydation d'une molécule de l'*O*-diphénol (par exemple, le catéchol) en *O*-quinone :



L'*O*-quinone ainsi formé prend part dans une série de réactions généralement non enzymatiques aboutissant à la formation des produits intensément colorés. Le mécanisme exact de ces réactions est encore mal connu.

D'après MATHEW et PARPIA (1971), les plus importantes réactions des *O*-quinones sont :

- (1) l'oxydation couplée des substances difficilement oxydables,
- (2) la combinaison avec les composés aminés et les protéines,
- (3) la condensation et la polymérisation.

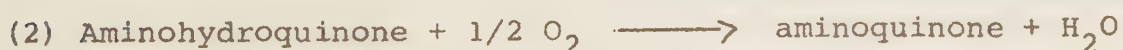
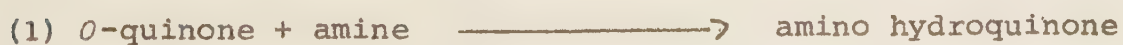
(1) Les *O*-quinones peuvent oxyder les composés dont les potentiels d'oxido-réduction sont faibles. Parmi eux, on peut citer les anthocyanines, les glycosides des flavones, l'acide ascorbique etc...

La réaction peut être représentée par l'équation suivante :



(2) La condensation des *O*-quinones avec les composés aminés a une importance particulière car dans la plupart des produits alimentaires un brunissement intense ne se produit qu'après une telle condensation. Cependant, on ne trouve guère de renseignements sur ce type de réactions dans la littérature, et il existe beaucoup de points obscurs dans nos connaissances.

La réaction des quinones avec des aminés simples a été signalée pour la première fois par CHODAT (1912). D'après JACKSON et KENDAL (1949) la réaction se déroule comme suit :



Cette réaction des quinones peut se produire avec des amines primaires ou secondaires, aliphatiques ou aromatiques (MASON, 1955 a). Par exemple, l'*o*-benzoquinone réagit avec l'aniline il se forme alors 4-5-dianilino 1-2-benzoquinone. Cette réaction a été utilisée pour l'identification des *o*-quinones par certains auteurs. BULOCK et al. (1951) ont montré que les indoles se condensent avec les *o*- et *p*-quinones en donnant des produits intensément colorés, les indolylquinones.

JAMES et al. (1948) et BEEVERS et JAMES (1948) ont étudié la réaction de quinones formés par voie enzymatique, avec divers amines et acides aminés. Dans les conditions d'expérimentation (à 30°C et à pH 7,8), les acides aminés tels la glycine, l'alanine, la leucine, l'acide aspartique, l'acide glutamique et les amines primaires donnaient une coloration brune-rougeâtre avec les *o*-benzoquinones, la coloration produite en présence des amines secondaires (diméthylamines, proline, sarcosine et nortropine) était pourpre foncée, tandis qu'avec les amines tertiaires, on n'observait pas de coloration. La variation du pH du milieu entre les valeurs 4,5 et 8,3 n'apportait pas ou peu de changement dans la vitesse de la réaction. D'après ces auteurs, les produits colorés formés sont des *p*-amino *o*-quinones.

JACKSON et KENDAL (1949) ont signalé de leur part que les pigments formés pendant l'oxydation des diphénols par un extrait polyphénoloxidasique en présence de divers composés aminés ont toujours une structure analogue. La réaction d'un *o*-quinone avec un composé aminé implique essentiellement une condensation d'une molécule d'*o*-quinone avec une molécule de composé aminé pour donner tout d'abord un leucopigment incolore qui est par la suite spontanément oxydé à une forme colorée.

Ces pigments sont solubles dans l'eau, l'alcool méthylique et éthylique mais insolubles dans d'autres solvants organiques. Ils se décomposent et ainsi se décolorent irréversiblement dans le milieu fortement acide. Cette décomposition est accompagnée par la libération d'une molécule de CO_2 .

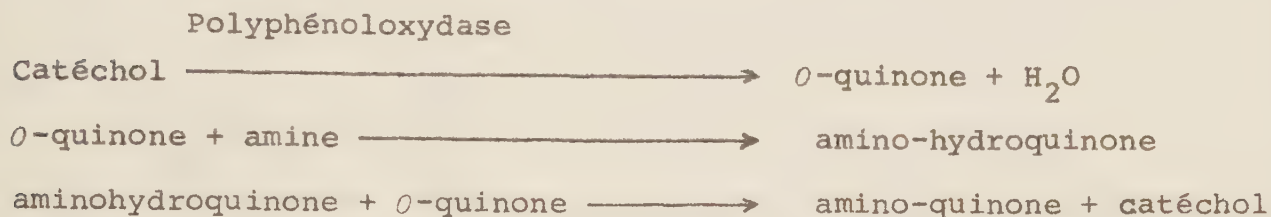
Une autre propriété très intéressante de ces pigments, c'est qu'ils catalysent l'oxydation des acides aminés, ce qui a pour résultat un dégagement de l'ammoniaque et la formation d'un acide organique selon l'acide aminé considéré (JAMES et al., 1948). Parmi les acides aminés, le glycolle présente une sensibilité considérable à une telle oxydation.

La combinaison des quinones avec des acides aminés soufrés, présente un aspect particulier. La liaison entre la molécule de quinone et la molécule d'acide aminé se fait en général par le groupement sulfhydrilé au lieu du groupement aminé (MASON 1955 a).

Les travaux de BLACKHALL et THOMSON (1953) ont montré que le groupement sulfhydrilé est beaucoup plus actif que le groupement aminé vis-à-vis des quinones. Ainsi, toute substance comportant de ce groupement dans sa molécule (c'est-à-dire les thiols) entre facilement en réaction avec les quinones.

Cependant, dans le cas des acides aminés soufrés, il peut y avoir une compétition entre ces deux groupements (MASON 1955 a). Mais d'une façon générale, c'est le groupement sulfhydrilé qui réagit le premier. D'après BURTON et DAVID (1952), le premier produit de la réaction d'un *p*-quinone avec la cystéine est le *p*-benzoquinonyl cystéine. Une condensation entre le groupement aminé de la chaîne latérale de la cystéine et l'atome d'oxygène du quinone dans la molécule de ce produit conduit à la formation du thiozine.

MASON (1955 b) dans ses travaux sur la réaction des protéines avec les *o*-quinones signale qu'en présence d'un groupement aminé ou sulfhydrilé, les pigments colorés ne se forment que lorsque l'*o*-quinone est en excédent. Selon l'auteur, ces réactions peuvent être représentées par les équations suivantes :



ROBERTS (1959) partage l'opinion de MASON (1955 b) à ce sujet. Cet auteur, en étudiant la réaction du catéchine-*o*-quinone avec la cystéine, a montré que lorsque la cystéine est présente en excédent par rapport au catéchine-*o*-quinone donne une molécule de cystéinyl-catéchine-*o*-quinone dont le polymère est à l'origine des pigments colorés.

Ainsi, la formation des pigments par la réaction des peptides ou des protéines avec des quinones dépend non seulement de leur réactivité vis-à-vis des quinones, mais aussi du rapport moléculaire entre ces substances.

(3) La troisième voie possible de la formation des pigments à partir des *o*-quinones implique leur polymérisation et condensation.

Ainsi, la polymérisation des catéchine *o*-quinones formés par voie enzymatique donne naissance à des phlobatannins (HATHWAY et SEAKINS, 1957).

La formation de la mélanine, un polymère de poids moléculaire élevé et intensément coloré, à partir d'un acide aminé phénolique, de la tyrosine, est un exemple bien connu de ce type de réactions.

Comme nous l'avons vu, la hydroxylation enzymatique de cet acide aminé donne la dihydroxy-3-4-phenylalanine (DOPA) qui est par la suite oxydée en dopaquinone. Et puis, il se produit un réarrangement moléculaire :



Le leucodopachrome ainsi formé est ultérieurement oxydé pour donner le dopachrome :



La décarboxylation et le réarrangement de ce produit aboutit à la formation du 5-6 dihydroxyindole qui par une oxydation se transforme en indole 5-6 quinone. Et enfin, la polymérisation et l'oxydation de ce dernier conduit à la dopa-mélanine.

2.4. INHIBITION DES REACTIONS DE BRUNISSEMENT ENZYMATIQUE

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la première étape de ces réactions, la conversion des diphenols en quinones correspondants, exige à la fois la présence de l'enzyme et de l'oxygène disponible. Ainsi, les facteurs qui affectent la vitesse des réactions de brunissement enzymatique seront ceux qui influencent l'activité de l'enzyme, tels la concentration du substrat et de l'enzyme, le pH, la température, la présence de certains produits chimiques, etc...

Par conséquent, les méthodes du contrôle ou de l'inhibition du brunissement du type enzymatique seront basées sur ces principes.

La sélection des variétés de matières premières pauvres en polyphénols et en polyphénoloxydase peut être une première précaution à prendre. Et puis, on fait appel aux autres méthodes que nous allons étudier brièvement.

2.4.1. Inhibition par la chaleur

L'application de la chaleur est la méthode la plus simple qui provoque la dénaturation des polyphénoloxydases. Cette méthode est largement utilisée dans l'industrie alimentaire en vue d'inhiber le brunissement d'origine enzymatique.

L'efficacité d'un traitement thermique dépend de la température, de sa durée, et du pH du produit mis en cause.

L'influence de la chaleur sur l'activité polyphénoloxydasique dans les purées de fruit a été étudiée par DIMICK et al. (1951). A 80°C pendant 8 secondes, il reste dans le produit 50 % de l'activité polyphénoloxydasique mais lorsqu'on atteint à 90°C l'enzyme est presque totalement inhibé pour une même durée de chauffage.

Un autre facteur qui détermine l'efficacité de chauffage sur l'inhibition des enzymes, c'est l'état hydratation des produits. Ainsi, les polyphénoloxydases dans les fruits sont beaucoup plus thermostables que celles dans les jus de fruit.

Le traitement thermique des produits alimentaires, bien qu'il soit une méthode assez efficace pour inhiber les polyphénoloxydases, il présente cependant un certain nombre d'inconvénients : l'apparition des flaveurs non désirables, des changements défavorables dans les tissus des produits.

2.4.2. Inhibiteurs chimiques

Les inhibiteurs chimiques des réactions de brunissement enzymatique sont très nombreux. On peut les classer en trois groupes d'après leur action dans les réactions de brunissement :

- Les anti-oxydants,
- Les inhibiteurs de l'enzyme,
- Les produits qui réagissent avec le substrat de l'enzyme.

Cependant, la plupart de ces produits chimiques ne peuvent être utilisés dans l'industrie alimentaire, étant donnés leurs effets toxiques.

L'influence de la chaleur sur l'activité polyphénoloxydasi-
que dans les purées de fruit a été étudiée par DIMICK et al. (1951).
A 80°C pendant 8 secondes, il reste dans le produit 50 % de l'acti-
vité polyphénoloxydasi-que mais lorsqu'on atteint à 90°C l'enzyme est
presque totalement inhibé pour une même durée de chauffage.

Un autre facteur qui détermine l'efficacité de chauffage sur
l'inhibition des enzymes, c'est l'état hydratation des produits. Ain-
si, les polyphénoloxydases dans les fruits sont beaucoup plus thermos-
tables que celles dans les jus de fruit.

Le traitement thermique des produits alimentaires, bien qu'il
soit une méthode assez efficace pour inhiber les polyphénoloxydases,
il présente cependant un certain nombre d'inconvénients :
l'apparition des flaveurs non désirables, des changements défavorables
dans les tissus des produits.

2.4.2. Inhibiteurs chimiques

Les inhibiteurs chimiques des réactions de brunissement en-
zymatique sont très nombreux. On peut les classer en trois groupes
d'après leur action dans les réactions de brunissement :

- Les anti-oxydants,
- Les inhibiteurs de l'enzyme,
- Les produits qui réagissent avec le substrat de l'enzyme.

Cependant, la plupart de ces produits chimiques ne peuvent
être utilisés dans l'industrie alimentaire, étant donnés leurs effets
toxiques.

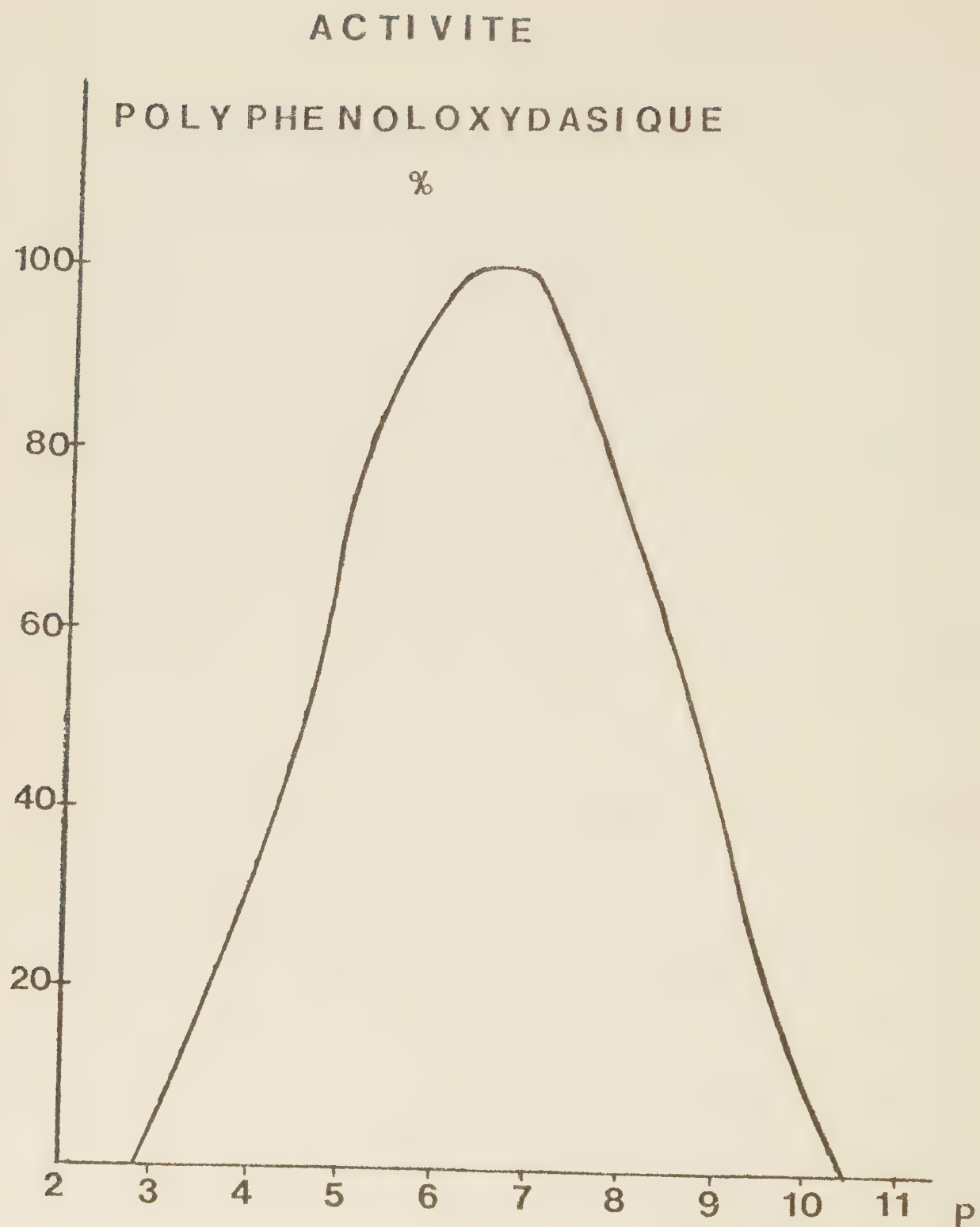


FIGURE 11 Influence du pH sur l'activité polyphénoloxysasique
(D'après ESKIN et al., 1971)

2.1. Inhibition par le SO_2

Parmi les inhibiteurs chimiques, le SO_2 est largement utilisé notamment sous la forme de bisulfite et sulfite dans l'industrie alimentaire.

Le mécanisme d'inhibition a fait l'objet d'un certain nombre de travaux et deux différentes hypothèses ont été émises à ce sujet.

D'après PONTING (1960), le SO_2 inhibe l'activité polyphénoloxydasique. Alors que pour EMBS et MARAKIS (1965) l'inhibition se réalise par la combinaison du SO_2 avec les *O*-quinones. Ainsi, les réactions des *O*-quinones conduisant à la formation des pigments colorés n'auraient pas lieu.

Le SO_2 est généralement considéré comme un inhibiteur très efficace. Cependant, dans certains cas, il peut affecter les qualités organoleptiques des produits.

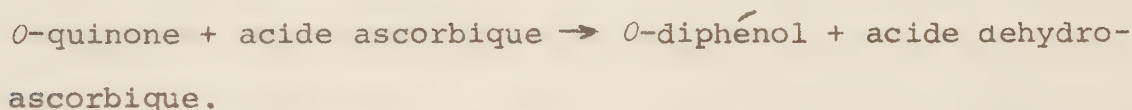
2.2. Inhibition par les acides

L'activité polyphénoloxydasique était directement liée au pH du milieu, l'acidification des produits alimentaires peut être un moyen efficace pour inhiber les réactions de brunissements.

La figure (11) nous indique l'activité polyphénoloxydasique en fonction du pH du milieu. On voit que le pH optimum d'activité se trouve entre les valeurs de pH 6-7 et qu'en dessous du pH 3, l'activité est nulle.

L'addition de certains acides inhibe le brunissement non seulement par la modification du pH du milieu mais aussi par la chélation du groupement prosthétique de l'enzyme (ESKIN et al., 1971). C'est le cas notamment de l'acide malique et l'acide citrique. Les travaux de PONTING (1963) ont montré que l'acide malique est beaucoup plus efficace que l'acide citrique pour un pH donné.

L'inhibition par l'acide ascorbique présente un aspect différent des autres acides. Le mode d'action dans les réactions de brunissement enzymatique peut être représenté comme suit (KERTESZ et ZITO 1962) :



L'O-quinone formé est réduit en O-diphénol initial par l'acide ascorbique.

Cette substance est largement utilisée comme inhibiteur notamment dans les jus de fruit.

2.3. Inhibition par d'autres produits chimiques

Le chlorure de sodium peut inhiber dans une certaine mesure l'oxydation enzymatique des polyphenols. Néanmoins, une inhibition complète ne peut être obtenue qu'avec des concentrations très élevées de cette substance. Par conséquent, son application est très limitée dans l'industrie.

BEDROSIAN et al. (1959) ont étudié l'inhibition de réaction de brunissement par les borates. Ils ont montré que le brunissement

des pommes coupées étaient complètement inhibé par le traitement avec 1,5 % de tétraborate de sodium. Ces produits se combinent avec le groupement *O*-dihydroxyldes polyphenols.

TAEUFEL et VOIGT (1964) ont testé un certain nombre de sels minéraux, et ont montré que les bromures, chlorures, fluorures et les thiocyanures inhibaient le brunissement enzymatique tandis que les nitrates et les phosphates étaient sans effet, par contre, les sulfates le favorisaient.

2.5. BRUNISSEMENT ENZYMATIQUE DES POLYPHENOLS EN MALTERIE- BRASSERIE

L'oxydation enzymatique des polyphenols qui se produit probablement pendant les opérations de malterie-brasserie a fait, dans le passé, l'objet d'un certain nombre de travaux où règnent les opinions très divergentes vis-à-vis de son rôle sur la formation de la couleur.

Les travaux de JUST (1940) concluent à la non intervention des oxydases dans la formation de la couleur du moût ou en tout cas leur fixe un rôle vraiment minime.

JUST et HOFER (1941) prouvent que dans l'extrait d'orge et de malt, il y a des enzymes capables d'oxyder les substrats comme le pyrogallol et la *p*-phénylènediamine, surtout à pH 8. Ils étudient la thermostabilité de ces enzymes (réduction de 50 % d'activité après 3 heures à 70°C, de 100 % après 3 heures à 85°C). Pour ces auteurs, le pH du moût est trop éloigné de la valeur idéale de 8 pour que les oxydases aient un rôle actif en brasserie. Le moût par infusion serait plus riche en oxydases que le moût obtenu par décoction : cela se com-

prend par la thermostabilité de ces enzymes.

Les travaux de WALLERSTEIN et al. (1947) montrent que l'orge et le malt contiennent une oxydase active en milieu acide qui présente une activité maximum à pH 3,3 sur le substrat *o*-phénylènediamine. Le maltage développe cette activité oxydasique, surtout dans l'embryon, sans incidence notable du touraillage. A l'empâtage, l'activité décroît durant le stade à 70°C et s'annule à l'ébullition du moût.

Cette activité oxydasique se retrouve dans les grains crus, maltés ou non, tout particulièrement dans le blé. Les auteurs ont ensuite étudié une activité pyrogallol-oxydasique dans les conditions suivantes : pH 6,8 , 40 minutes à 25°C. (WALLERSTEIN et al. 1948).

L'activité de la pyrogallol-oxydase est doublée au cours du maltage et cette activité est très élevée dans l'embryon. Il y a une perte d'un tiers d'activité au touraillage. A l'empâtage, cette activité diminue rapidement, avant le stade à 70°C.

Un inhibiteur dialysable et thermostable de cette enzyme a été trouvée dans le malt touraillé. Il n'est pas sûr que l'*o*-phénylènediamine-oxydase soit identique à la pyrogallol-oxydase.

Enfin, WALLERSTEIN et al. (1954) recherchent si les oxydases influent ou non la formation de la couleur du malt et du moût. Les auteurs isolent par fractionnement l'activité oxydase et montrent qu'à 45°C, mise en présence de moût, la coloration du moût augmente notablement. Une protéolyse dans la maische favorise une augmentation de la couleur et les auteurs pensent à l'intervention de la tyrosine et de la dopa.

On aboutit donc à une opinion contredisant celle de JUST.

D'autre part, un moût non bouilli contient bien une activité peroxydasique puisqu'il suffit d'ajouter de l'eau oxygénée pour

favoriser une augmentation de la couleur du moût. Mais dans la pratique, ces peroxydases n'interviennent pas faute d'une présence en quantité suffisante d'eau oxygénée (CHAPON et CHEMARDIN 1964).

Un dernier travail d'isolement des fractions responsables des activités phénoloxydasiques et peroxydasiques a été dû récemment à STEINER (1968), mais l'auteur ne s'occupe pas de leur influence possible sur la formation de la couleur. Le malt touraillé contient une faible activité phénoloxydasique.

La meilleure stabilité colloïdale des bières produits à partir de malt vert est due à l'action des polyphénoloxydases.

Une observation très intéressante a été faite récemment par SCRIBAN (1971), lors du brassage du malt vert. Malgré le taux élevé des polyphénoloxydases et malgré un stationnement prolongé à 45°C, il n'y a pas de formation de couleur dans un moût de malt vert, maintenu longtemps au stade de protéolyse ce qui infirme l'opinion de WALLERSTEIN et al. (1954) à ce sujet.

Examinons maintenant les travaux récents de SCRIBAN et DUPONT (1973).

Ces auteurs ont étudié en premier lieu la thermostabilité des polyphénoloxydases au touraillage et à l'ébullition du moût.

Au séchage du malt vert, l'inhibition peut atteindre 60 % avant la montée au coup de feu. Elle se poursuit ensuite lentement au coup de feu. En fin de touraillage, il reste environ 30 % d'activité polyphénoloxydasique dans le malt.

Au chauffage du moût, donc en milieu liquide, l'inhibition est rapide dès 80°C. En 20 minutes, il reste moins de 20 % d'activité.

Il y a une tendance à la disparition d'antocyanogènes au cours du séchage du malt vert et cela peut être due aux "anthocyanoge-

II
nases mentionnées par POLLOCK et al. (1960), dans des conditions d'aération intense de la zone périphérique du grain.

Au brassage, durant l'empâtage du malt, on constate une activité importante des polyphénoloxydases à 70°C et une action marquée sur la couleur du moût.

NARZISS et SEKIN (1974) étudient l'évolution de l'activité polyphénoloxydasique, mesurée par la variation de D.O. à 150 nm dans une solution de pyrocatechine additionnée de l'extrait enzymatique pendant 30 minutes au cours du maltage et du brassage.

L'activité se développe rapidement au cours des quatre premiers jours de germination. Elle diminue ensuite très légèrement durant les sixième et septième jours.

Au cours du séchage, la perte d'activité est de l'ordre de 40 %. Une perte supplémentaire de l'ordre de 30 % qui dépend de la température, a lieu pendant le coup de feu.

Au brassage, l'activité polyphénoloxydasique est également en fonction de la température, entre 35 et 45°C, on n'observe pas de variation, à 50°C, elle a tendance à se développer alors qu'à 65 et à 75°C, l'augmentation de l'activité est suivie d'une chute rapide.

En conclusion, nous constatons que la présence des polyphénoloxydases est absolument indiscutable dans le malt et le moût. Cependant, les auteurs sont en désaccord quant à leur rôle sur la formation de la couleur du moût. De plus, aucun auteur ne parle de leur action possible au maltage, plus particulièrement au stade dit enzymatique de séchage.

Au brassage, l'étude de la fraction polyphénolique du malt, de son pouvoir colorant, suite à l'action des polyphénoloxydases à l'empâtage et avant l'ébullition du moût ou à une oxydation chimique,

nécessite des travaux complémentaires.

D'autre part, l'étude des diverses propriétés des polyphénoloxydases de l'orge et du malt pourrait nous aider afin de mieux comprendre leur importance en malterie-brasserie.

3. CONCLUSIONS

Cette étude bibliographique sur les réactions de brunissement dans l'industrie alimentaire et plus particulièrement dans l'industrie brassicole soulève à présent de nombreux problèmes non résolus en dépit de l'intensité des travaux effectués par les chercheurs du monde entier.

En ce qui concerne les réactions de Maillard qui sont les plus fréquentes dans de nombreux secteurs de l'industrie alimentaire et dominantes dans l'industrie brassicole, les points obscurs se trouvent à plusieurs niveaux.

Les problèmes concernant le mécanisme des réactions des aldoses avec les amines et avec les acides aminés sont en grande partie résolus. Par contre, on ignore encore le comportement des cétooses dans ces réactions. De même dans le cas des protéines dont le mécanisme d'action avec les composés carbonylés semble être encore plus difficile à élucider.

En dehors de ces problèmes d'ordre purement chimiques, il faut maintenant transposer les connaissances acquises dans le cadre complexe des produits alimentaires. Car, comme nous l'avons vu, au cours de cette revue générale, les recherches ont été souvent effectuées sur des systèmes modèles simples qui facilitent grandement la tâche.

L'isolement, l'identification et si possible le dosage des produits intermédiaires et leurs influences sur la qualité des produits alimentaires d'une part, et l'étude cinétique de ces réactions au cours des processus technologiques d'autre part, doivent être les objectifs principaux des travaux futurs.

Dans le domaine des réactions de brunissement enzymatique, les travaux réalisés depuis une vingtaine d'années ont abouti à un progrès certain dans la connaissance des polyphénoloxydases et des polyphénols des produits alimentaires. Cependant, comme dans le cas de réactions de Maillard, les chercheurs ont fréquemment étudié l'action de la polyphénoloxydase sur un certain nombre de composés polyphénoliques dans des systèmes modèles. Ce qui a permis de connaître les différents mécanismes possibles conduisant au brunissement des aliments.

Il serait désormais opportun d'orienter les recherches vers les transformations biochimiques de la fraction polyphénolique des produits alimentaires sous l'action de leur propre enzyme au cours de la fabrication. De plus, une meilleure connaissance de l'importance de tel ou tel type de réaction secondaire des *O*-quinones, qui finit par altérer la qualité des produits, pourrait permettre de trouver des remèdes beaucoup plus efficaces.

Dans le cadre du présent travail, *nous nous sommes placés dans une optique d'ingénieur* pour étudier notamment les problèmes relatifs aux réactions de brunissement non-enzymatique en liaison avec la qualité du malt.

En premier lieu, nous nous sommes intéressés aux transformations biochimiques qui se produisent dans le malt vert au cours du coup de feu dont les conditions physiques sont parfaitement favorables pour le développement des réactions de Maillard.

Une telle étude ne peut être entreprise sans tenir compte des paramètres physiques tels que la température, le temps, et l'humidité dont l'étude bibliographique nous a montré toute l'importance.

Ensuite, dans la ligne de ce même travail, nous avons abordé

le rôle de la température du malt à la descente du touraille et du temps d'ensilage sur la qualité du malt.

L'importance du degré d'humidité du malt sur les transformations biochimiques qui prennent lieu au cours du coup de feu, nous a incité à nous pencher sur le problème de la sorption du malt. A ce sujet, une étude préliminaire a été mise en oeuvre afin de nous permettre de mieux nous rendre compte de ces transformations dans le malt au touraillage qui est un milieu d'hydratation variable.

Nous avons ensuite entrepris une étude sur l'isolement et l'identification des cétose-amines du malt. Car, comme nous l'avons vu, ces substances jouent le rôle de plaque tournante dans le déroulement des réactions de Maillard. C'est ainsi qu'elles sont considérées dans la littérature scientifique de l'industrie alimentaire, comme les précurseurs d'arômes et de coloration. Leur importance est accrue dans le cas de l'industrie brassicole étant donné leurs propriétés réductrices pour la bière.

Les cétose-amines et d'autres substances réductrices comme les réductones et les mélanoidines qui se forment par la voie des réactions de Maillard dans le malt, notamment au cours du coup de feu, ont une action souvent favorable contre les méfaits bien connus de l'oxydation en brasserie. Le malt renferme en outre des réducteurs d'autres origines comme les composés polyphénoliques, les sulfites etc... La méthode ITT couramment utilisée en brasserie pour les réducteurs ne donne pas d'indications suffisamment précises sur les réducteurs. Nous avons alors fait appel à d'autres méthodes afin de déterminer ces substances le plus spécifiquement possible. Nous avons ensuite effectué une étude statistique de corrélation entre les valeurs trouvées par ces méthodes avec d'autres critères analytiques du malt.

Parmi les opérations de malterie-brasserie, la cuisson du moût constitue une autre étape favorable aux réactions de brunissement. Cependant, comme nous l'avons constaté, les chercheurs sont en désaccord quant au mécanisme de la réaction principale.

Ainsi, dans une dernière partie, en vue de connaître l'importance relative de diverses réactions de brunissement et surtout le degré d'engagement des acides aminés avec les sucres réducteurs, nous avons entrepris une étude sur des moûts modèles.

TRAVAUX PERSONNELS

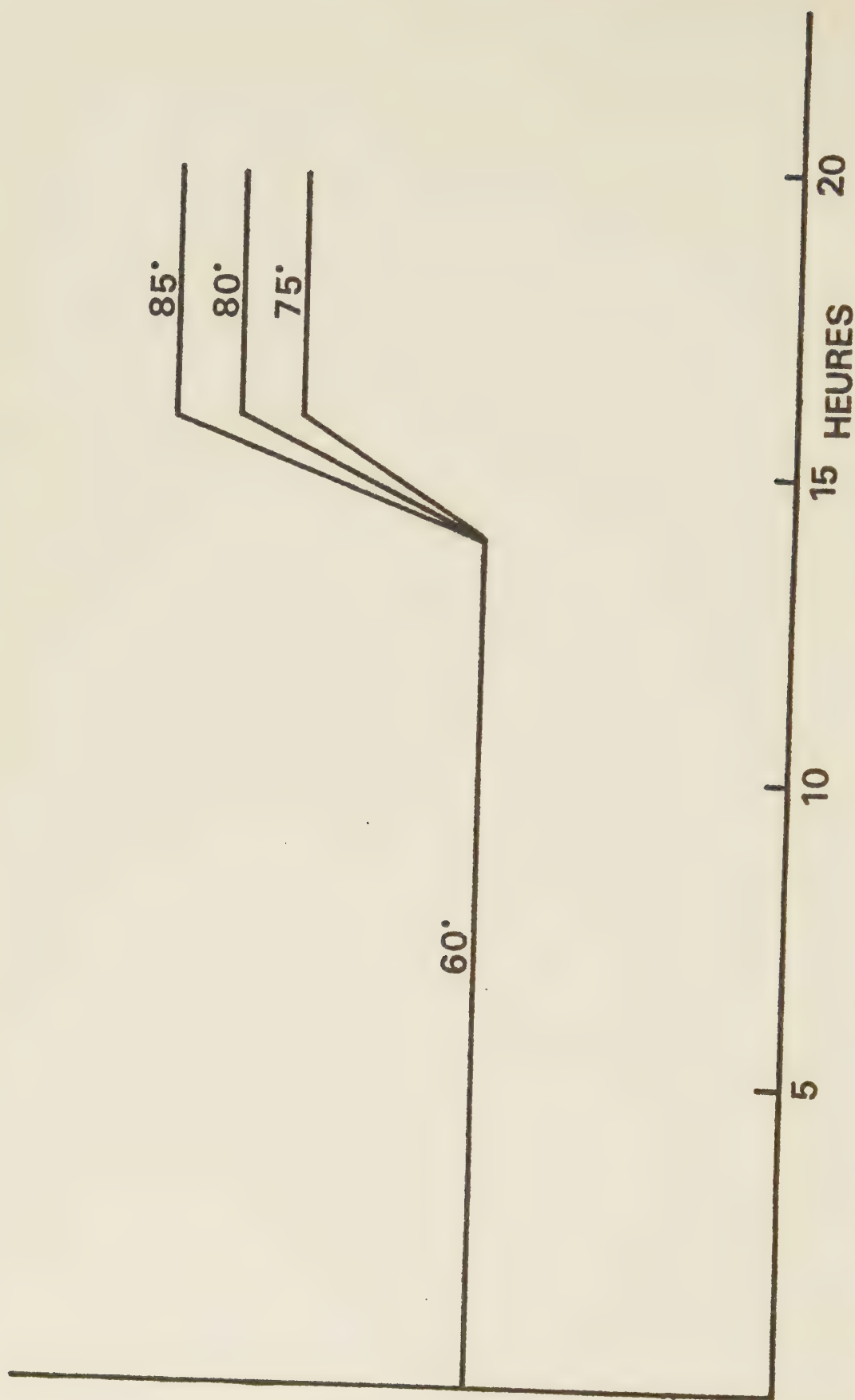


FIGURE 12 Diagrammes de température de touraillage

1. TRANSFORMATIONS BIOCHIMIQUES DU MALT VERT EN LIAISON AVEC LES RÉACTIONS DE BRUNISSEMENT AU COUP DE FEU

1.1. TECHNIQUES EXPERIMENTALES

1.1.1. Matériel d'étude

Le malt vert utilisé dans nos essais de touraillage nous a été fourni par la Malterie Laurent que nous remercions vivement. Ce malt vert a été fabriqué de façon classique à partir d'un lot d'orges de variété Trait d'Union. Après une période de trempage à 13°C durant 56 heures, l'orge est germée dans les cases de 25 Tonnes autonomes à 14-18°C pendant 110 heures. Un traitement à la gibberelline a eu lieu au début de la germination. La dose de l'acide gibberellique était de 0,04 ppm. En fin de germination, le malt vert avait une humidité de 45,1 %.

1.1.2. Touraillage

Les essais de touraillage ont été effectués dans une micro-touraille à chauffage électrique avec un débit d'air de 9,5 m³/h/kg. La capacité de cette microtouraille est de 5 kg de malt vert.

Les diagrammes de touraillage sont donnés dans la figure (12).

1.1.3. Méthodes analytiques

La couleur et le pouvoir diastasique du malt ont été mesurés d'après les méthodes EBC (Analytica, 1963).

Pour le dosage de l'activité *alpha*-amylasique, nous avons utilisé la méthode ASBC.

- Le test de surcoloration KOLBACH-ZASTROW

Ce test intéressant qui a été publié en 1963, tente d'approcher les effets de l'ébullition en chaudière industrielle. Il consiste à l'origine, à faire bouillir 200 ml de moût conventionnel sous reflux pendant 2 heures dans une fiole de 500 ml et sur un bain de glycérine à 108°C. Quelques modifications ont été apportées au mode opératoire par BENARD et SCRIBAN (1972) afin d'améliorer la répétabilité de la méthode.

Le mode opératoire que nous avons retenu tout au cours de ce travail, est le suivant :

- Prélever 125 ml de moût dans un ballon de 250 ml, à fond plat et col court, muni d'un raccord.

- Raccorder le ballon au réfrigérant à chicanes. On pourra s'assurer de l'efficacité de ce dernier en contrôlant le poids du ballon avec le moût avant et après cuisson.

- Immerger le ballon de manière à ce que le niveau du moût soit situé 1 cm au-dessous du niveau du bain-marie qui contient environ 20 litres d'huile de silicone dont la volatilité est très faible à 108°C. Mettre en route un compte-minutes dès l'immersion, et laisser cuire deux heures à 108°C ($\pm 0,25^\circ\text{C}$). On évitera d'exposer les ballons à la pleine lumière solaire.

- Relever le ballon et son réfrigérant. Laisser égoutter pendant une minute.

- Refroidir le ballon sous un courant d'eau froide.

- Ajouter 125 mg de kieselguhr, type Filter Cel.

.../...

- Mélanger et filtrer sur filtre Schleicher et Schüll 597 1/2 (ou équivalent). Refiltrer les premiers écoulements.
- Lorsque la filtration est complète, mesurer la couleur.

- Pouvoir réducteur

La méthode que nous avons retenue, a été proposée pour la première fois par CHAPMAN et MCFARLANE (1945). ADACHI (1958) et OKUHARA et SAITO (1970) ont modifié quelque peu le mode opératoire.

Cette méthode est basée sur la réaction du ferrocyanure de potassium formé par la réduction du ferricyanure de potassium ajouté dans l'échantillon, avec un sel de fer ferrique en formant le bleu de prusse qui présente un maximum d'absorption à 700 nm.

- Réductones

Nous avons adopté la méthode colorimétrique de MITSUDA et SHIKANAI (1958) qui a pour principe la décoloration d'une solution de DPI par réduction.

Nous donnerons plus loin les modes opératoires et les détails d'une étude analytique que nous avons réalisée sur ces méthodes.

- Acides aminés

Les dosages des acides aminés ont été effectués au moyen d'un auto-analyseur JEOL type JLC-5AH (résine LC R-1).

- Les glucides

Les glucides ont été dosés par la technique de chromatographie en phase gazeuse à partir de leurs dérivés triméthylsilylés, selon le procédé par étalonnage interne.

Préparation des échantillons pour analyse chromatographique

Dans les flacons de dérivatisation, introduire 0,5 ml de l'échantillon et 0,5 ml de la solution de phenyl- β -D-glucopyranoside (10 mg/ml), les lyophiliser.

Triméthylsilylation :

Réactifs :

Pyridine (Fluka 82 702)

Hexaméthylidisilasane (HMDS) (Merck-Schuchardt 804324)

Acide trifluoroacétique (Merck 8260)

Mode opératoire :

Dissoudre le lyophilisat de sucres dans 1 ml de pyridine, après quoi, ajouter immédiatement 0,9 ml de HMDS et 0,1 ml de l'acide trifluoroacétique. Agiter énergiquement le flacon pendant 30 secondes, le mettre à l'étuve à 50°C jusqu'à la clarification complète (une quinzaine de minutes) et le laisser reposer en agitant de temps en temps.

Appareillage utilisé

Chromatographie : Varian Aerograph 1440

Colonne : 1 m x 3 mm, inox.

Support ; Varaport 30, 100-120 mesh.

Phase stationnaire : 3 % O.V.17

Détecteur : ionisation de flamme.

Enregistreur : Varian A.25

Conditions opératoires

Débits :

Gaz porteur (Azote)	20 ml/mn
Hydrogène (Flamme)	25 ml/mn
Air comprimé (Flamme)	500 ml/mn

Température :

Injecteur : 260°C

Détecteur : 270°C

Colonne : programmation linéaire de la température
à partir de 120°C, 6°C/mn, jusqu'à 270°C.

Les échantillons ont été injectés à l'aide d'une micro-seringue de l'ordre de 0,4-0,5 µl.

La durée de l'analyse est de 22 mn.

Etalonnage

En vue d'établir les courbes d'étalonnage, nous avons analysé les solutions des sucres purs, contenant des quantités croissantes de chaque sucre, avec une quantité constante du phenyl- β -D-glycopyranoside.

L'intégration des pics par les mesures habituelles (planimétrie, triangulation) est longue, et nous avons constaté que dans notre

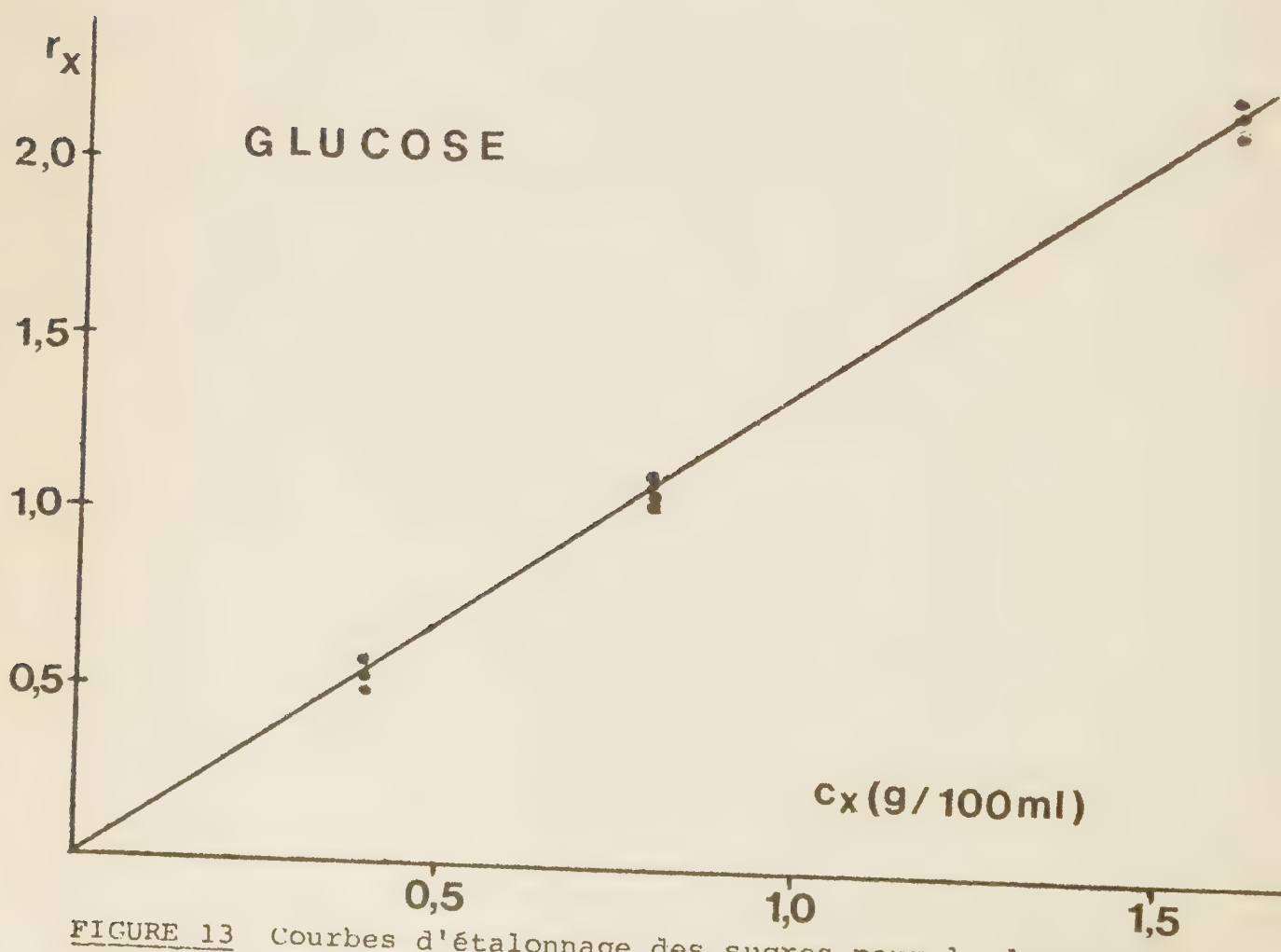
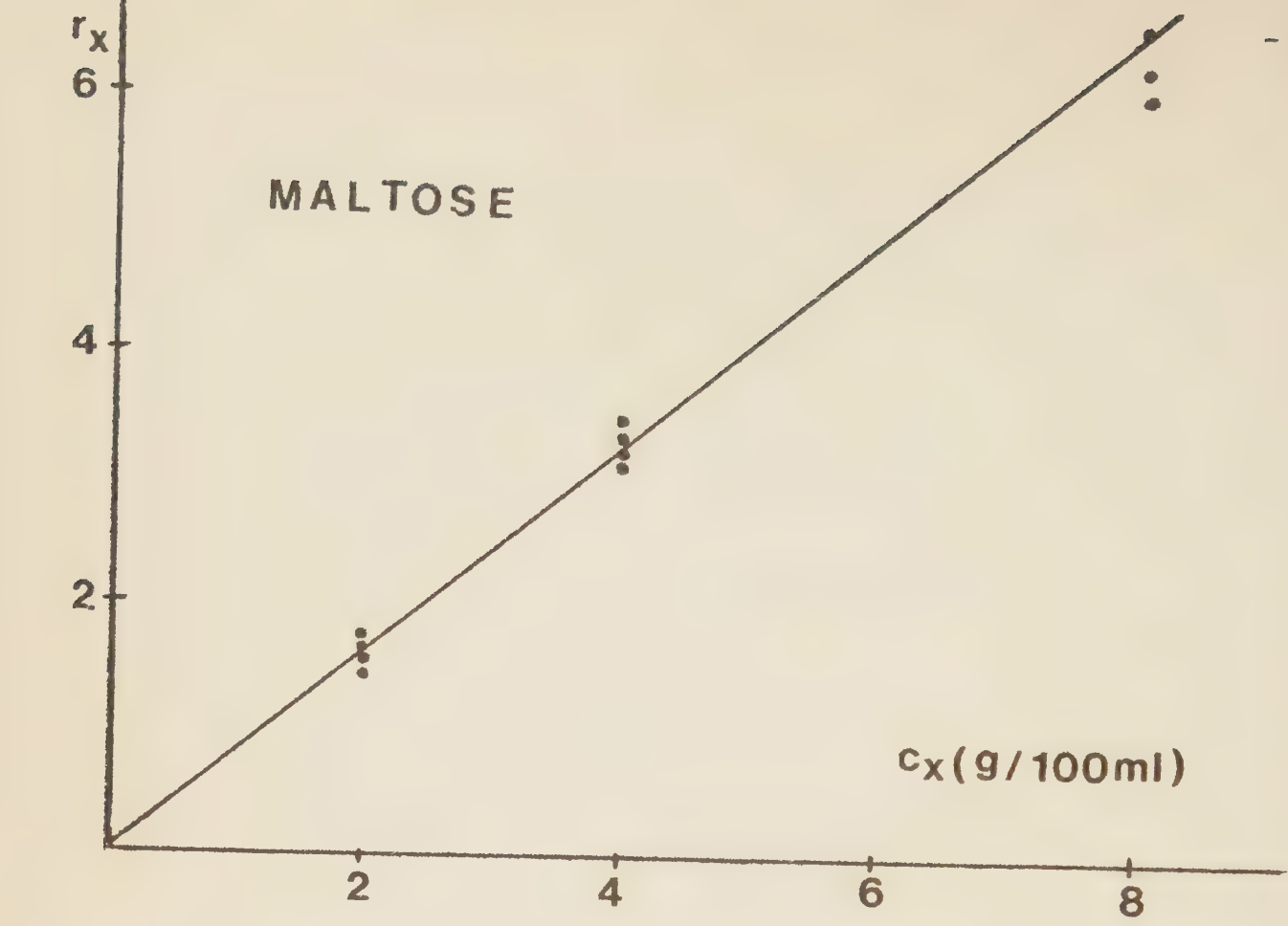


FIGURE 13 Courbes d'étalonnage des sucres pour le dosage par la technique de chromatographie en phase gazeuse (Seules celles de maltose et de glucose ont été données à titre d'exemple)

cas, la mesure de la hauteur des pics, apporte une précision et une reproductibilité au moins équivalentes. Pour chacun des sucres, il suffit donc de calculer le rapport :

$$r_x = \frac{h_x}{h_s} \quad \text{où}$$

h_x = hauteur de pic dû au sucre x (mm)

h_s = hauteur de pic dû au standart (mm)

et d'établir la courbe :

$$r_x = f(c_x) \quad \text{où}$$

c_x = concentration du sucre (g/100 ml)

Cette courbe étant droite, il est possible de calculer la pente (P_x) des courbes établies pour chaque sucre (Fig. 13).

Ainsi, dans nos conditions opératoires, les coefficients P_x étaient :

Fructose : 1,00

Glucose : 1,375

Maltose : 0,806

- Dosage de l'activité polyphenoloxidasique :

Extraction de l'enzyme à partir du malt :

La méthode à laquelle nous nous sommes arrêtés après différents essais de méthodes décrites dans la littérature, fait appel d'abord à l'élimination des substances phenoliques de la mouture du malt par l'acétone (MATHEW et PARPIA, 1971) puis une extraction de l'enzyme à partir de cette mouture par une solution tampon phosphate de pH 6,1 (SINGH et SHEORAN, 1972).

.../...

Mode opératoire :

5 g. de la fine mouture de malt sont introduits dans un erlen de 50 ml. On y ajoute 20 ml d'acétone, et on homogénéise pendant trente secondes. Puis, l'homogénat est mis sur un verre fritté (G-3). On le laisse filtrer sans utiliser le vide, après quoi, on passe dix fois 10 ml de l'acétone. A la fin du lavage, on utilise le vide. On élimine ensuite l'acétone dans un dessiccateur sous vide.

Pour extraire l'enzyme, 500 mg de mouture ainsi traitée sont introduits dans un tube de centrifuge. On y ajoute 7 ml de la solution tampon phosphate 0,1 M (pH 6,1) et on secoue mécaniquement pendant 5 minutes. On centrifuge ensuite à 10 000 tours/minute pendant 10 minutes.

La fraction surnageante est filtrée sur un papier peu serré pour débarrasser des débris.

A cause de l'inactivation rapide de l'enzyme, toutes ces opérations s'effectuent à 4°C.

Mesure de l'activité enzymatique

Nous avons adopté la méthode colorimétrique proposée par PONTING et JOSLYN (1948). Elle est basée sur la mesure spectrophotométrique du développement dans le temps de la coloration jaune due à l'oxydation du catéchol en *ortho*-quinone, par l'oxygène de l'air en présence de polyphenoloxydase.

Mode opératoire :

Dans un tube à essai, on pipette 5 ml de tampon phosphate 0,1 M (pH 6,1) et 2 ml de catéchol 0,5 M. On laisse le tube dans un bain-marie à 30°C pendant 10 minutes. Puis, on y ajoute 1 ml de l'extrait enzymatique et on met le chronomètre en route. Après l'avoir

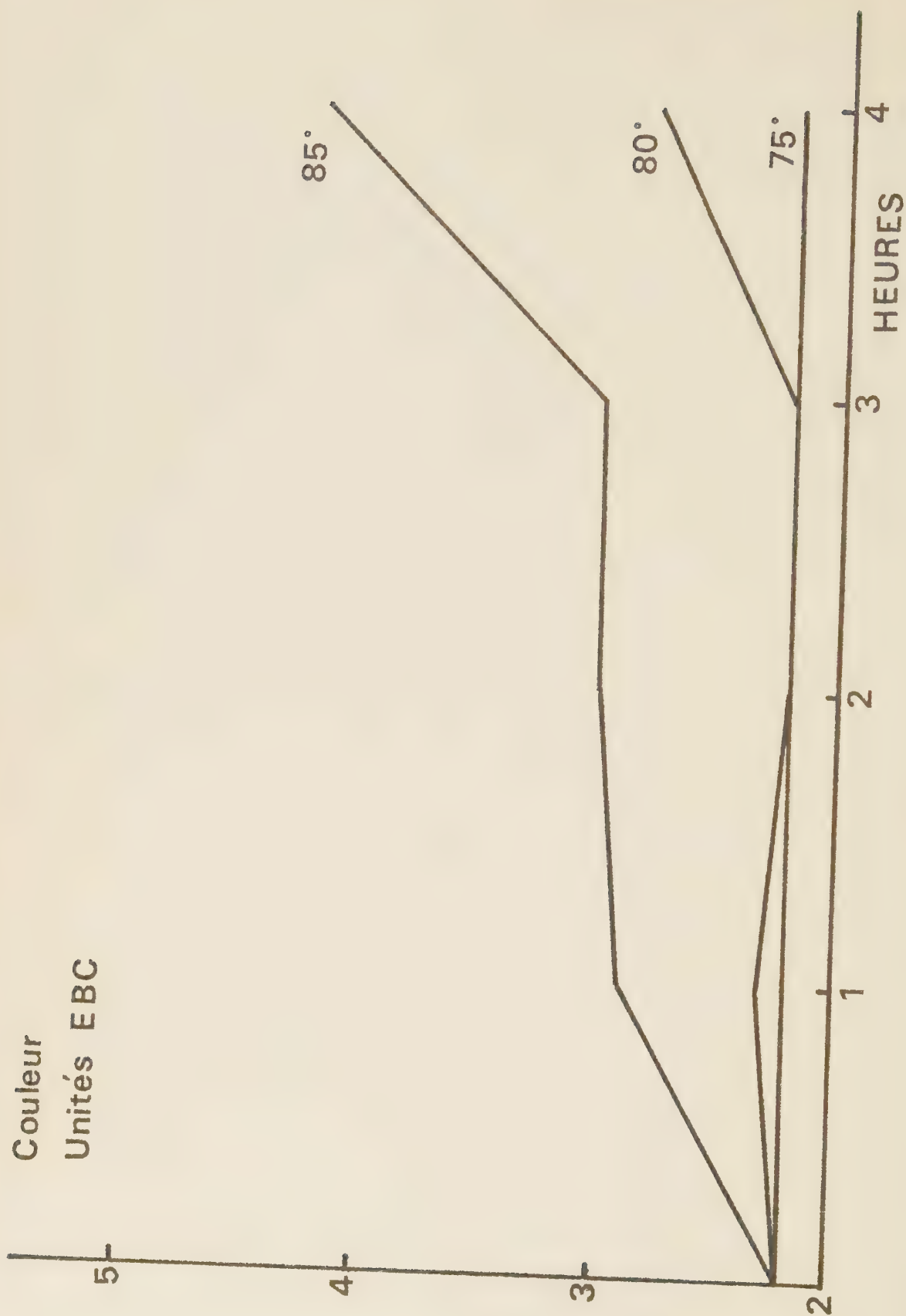


FIGURE 14 Evolution de la couleur du malt au cours du coup de feu pour trois niveaux de

bien agité, on remplit la cuve (1 cm) d'un spectrophotomètre thermostaté à 30°C.

A partir de la deuxième minute, on marque toutes les deux minutes, les valeurs de D.O obtenues à 420 nm. La cuve témoin contient les mêmes éléments sauf l'extrait enzymatique qui est remplacé par de l'eau distillée.

L'activité polyphenoloxidasique est exprimée par l'augmentation de D.O par minute et par ml d'extrait enzymatique.

1.2. RESULTATS ET DISCUSSION

1.2.1. Evolution de la couleur et de la surcoloration

Les figures (14), (15) et (16) montrent l'évolution de la couleur, de la surcoloration KZ et de l'écart entre ces données en fonction du temps pour trois niveaux de température de coup de feu.

Le rôle de la température du coup de feu est déterminant sur la formation de la couleur du malt. A l'examen de la figure (14) on peut noter que l'évolution à 75°C est pratiquement nulle, alors qu'à partir de 80°C, et notamment durant la quatrième heure de coup de feu, la couleur évolue considérablement. Nous confirmons ainsi les résultats de SCRIBAN et DUPONT (1973) concernant l'influence de la température de coup de feu.

La mesure de la couleur du moût conventionnel après le test de KOLBACH-ZASTROW, en dehors de son intérêt pratique sur le plan technologique, peut être un critère indirect mais beaucoup plus significatif que la couleur du moût conventionnel pour l'intensité des réactions de brunissement qui se sont déroulées au coup de feu. En effet, la couleur formée pendant ce test provient essentiellement des réactions de

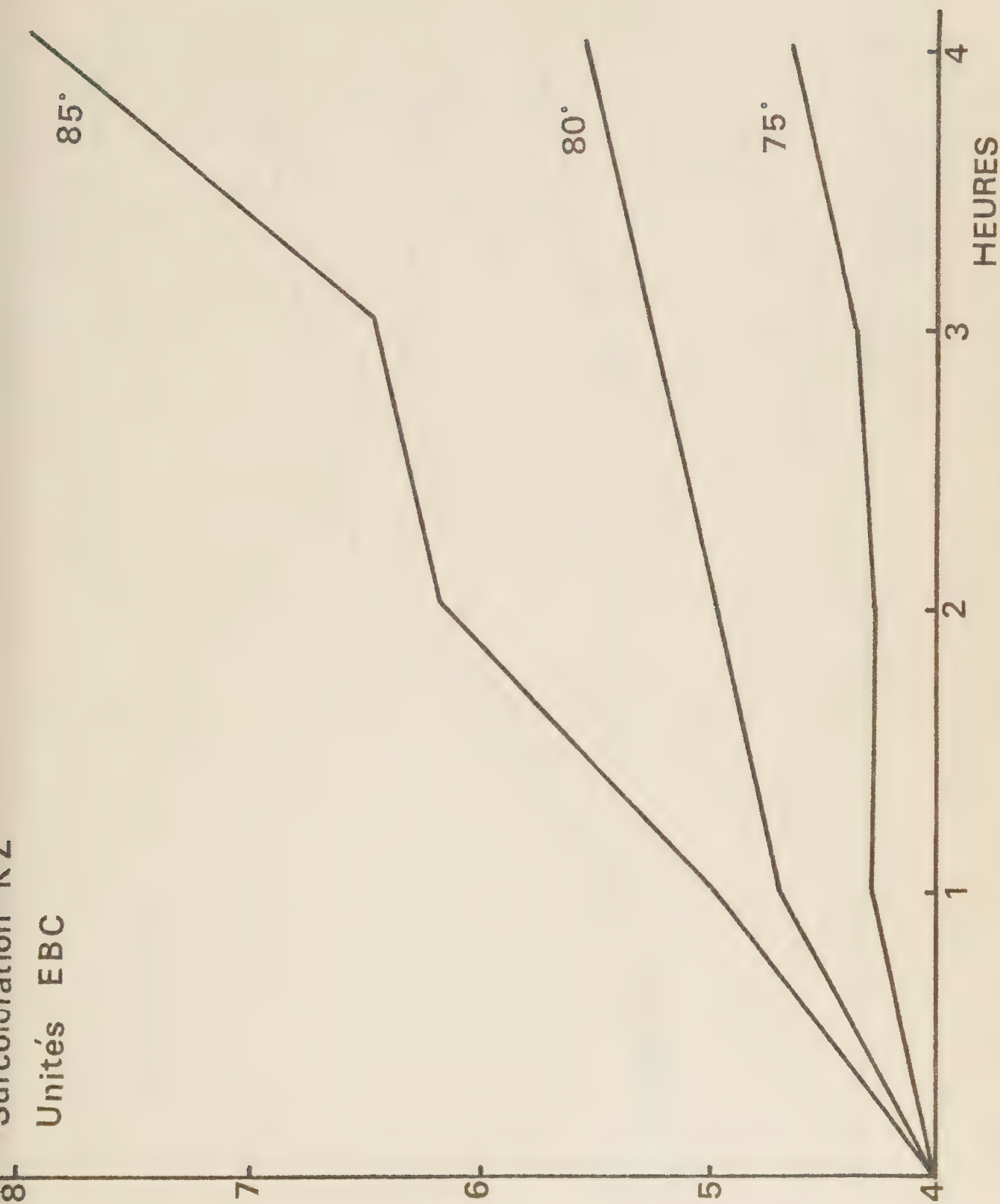


FIGURE 15 Evolution de la surcoloration KZ du malt au cours du coup de feu pour trois niveaux de températures (75, 80, 85°C)

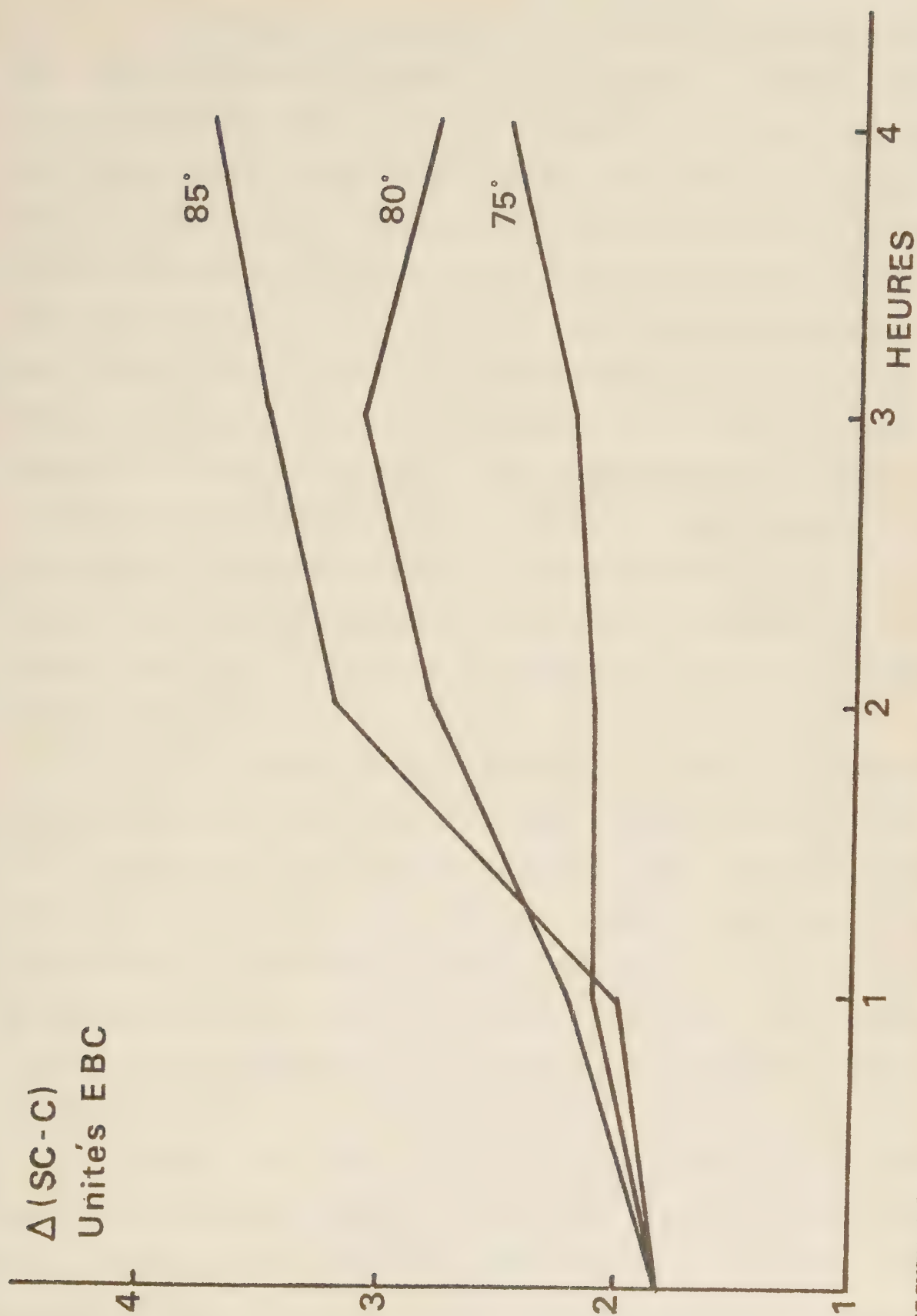
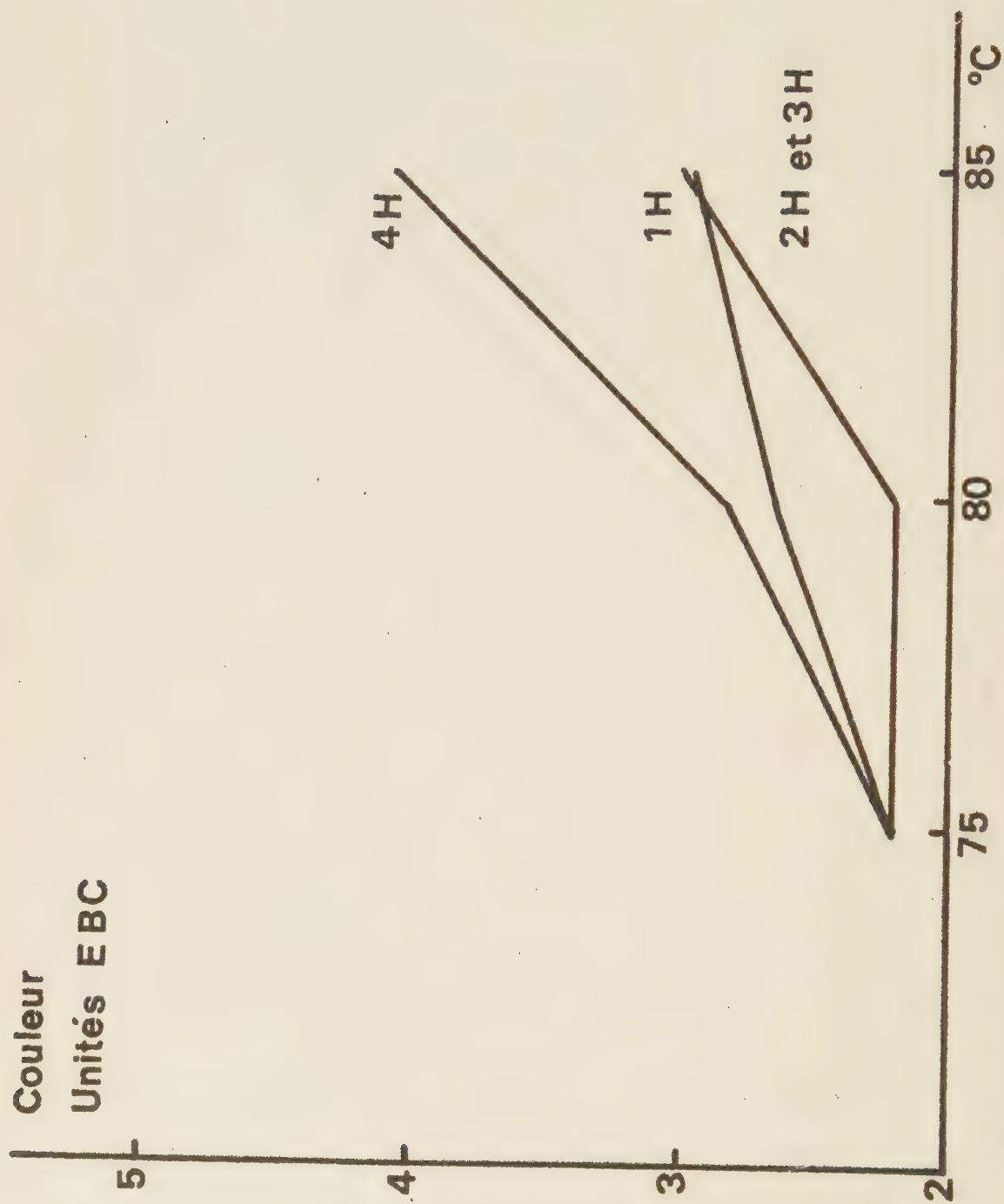


FIGURE 16 Evolution de l'écart (surcoloration KZ-couleur) au cours du coup de feu pour trois niveaux de température

Maillard (HASHIMOTO et KOIKE, 1971) le rôle des polyphénols étant très réduit (HASHIMOTO et KOIKE, 1971 ; SCRIBAN et DUPONT, 1973). La cuisson du moût constitue donc, d'une part, une étape complémentaire pour les réactions de Maillard qui sont déjà très sérieusement amorcées au touraillage et qui ne sont pas encore arrivées au stade de la formation poussée des pigments bruns ; d'autre part, la cuisson donne lieu au démarrage de nouvelles réactions oses-acides aminés mais elles ne jouent pas un rôle prépondérant sur la formation de la couleur à l'ébullition (voir le chapitre 6). En effet, un moût modèle contenant les oses principaux et les acides aminés d'un moût conventionnel en quantité équivalente à celle d'un moût naturel, ne donne qu'une faible coloration au test de surcoloration KZ, alors que la couleur d'un moût conventionnel se multiplie en général par un facteur variable de 1,5 à 2,5 après ce test, montrant ainsi le rôle préparatoire du touraillage.

Il y a encore un autre phénomène signalé par SCRIBAN (1971) qui concorde bien avec ce point. C'est, d'après l'auteur, l'existence d'un inhibiteur de coloration dans le malt vert. L'auteur arrive à cette conclusion à partir du fait que le moût du malt vert ne prend que très peu de coloration au test de KZ. En fait, à notre avis, ce phénomène ne serait pas dû à un inhibiteur mais tout simplement à l'absence des précurseurs des pigments bruns (prémélanoïdines) dans le moût du malt vert.

Enfin, cette conclusion analogique a été récemment confirmée expérimentalement par ADRIAN (1973 b). Cet auteur a montré que les produits formés au cours d'un traitement thermique préliminaire sont susceptibles d'exercer ensuite un rôle de précurseur ou de catalyseur au cours de chauffages ultérieurs et de renforcer ainsi les effets des réactions de Maillard se développant tout au long d'un processus tech-



nologique complexe.

C'est ainsi que les évolutions de la surcoloration de KZ et de l'écart (surcoloration KZ-couleur) des malts présentées dans les figures (15) et (16) nous montrent d'une manière beaucoup plus nette le déroulement des réactions de brunissement pendant le coup de feu. Ces deux données analytiques évoluent progressivement dans le malt en fonction du temps et ils se distinguent pour chaque stade de température à partir de la première heure du coup de feu.

Afin de mieux visualiser l'influence de la température, nous avons tracé des courbes d'évolution de la couleur, de la surcoloration et de l'écart entre ces deux données en fonction de la température pour chaque heure du coup de feu (Fig. 17,18,19).

Ces courbes nous révèlent deux phénomènes bien distincts :

- la dépendance de ces données au niveau de la température de coup de feu.

- l'existence d'une période de coup de feu définie où la surcoloration et l'écart (SC - C) se développent considérablement. C'est notamment le cas pour des essais de coup de feu effectués à 80 et 85°C, où on note une évolution très particulière de ces valeurs durant la deuxième heure du coup du feu. Comme nous le verrons, ce phénomène peut être attribué aux changements de l'état de l'humidité du malt pendant cette période.

Etant donné le rôle important de l'humidité du milieu peu hydraté sur la cinétique des réactions de Maillard et en liaison avec le point précédent, il était très intéressant d'étudier l'évolution de ces trois critères en fonction de l'humidité d'équilibre du malt prélevé au cours du coup de feu.

Comme en témoignent les courbes des figures (20), (21) et (22), ces trois données présentent une allure très significative

.../...

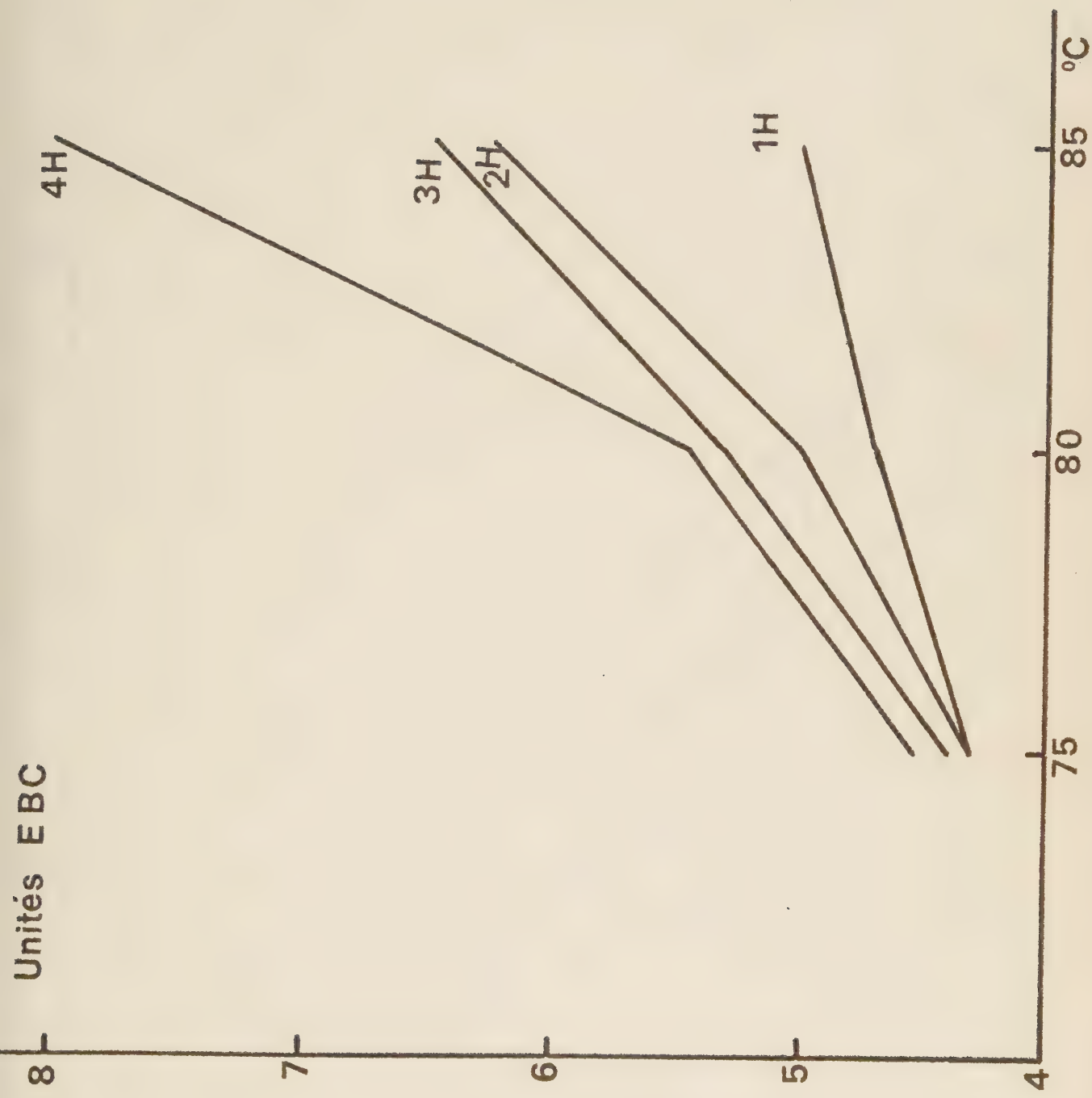


FIGURE 18 Evolution de la surcoloration KZ du malt en fonction de la température pour chaque heure du coup de feu



FIGURE 19 Evolution de l'écart (surcoloration KZ-couleur) en fonction de la température pour chaque heure du coup de feu.

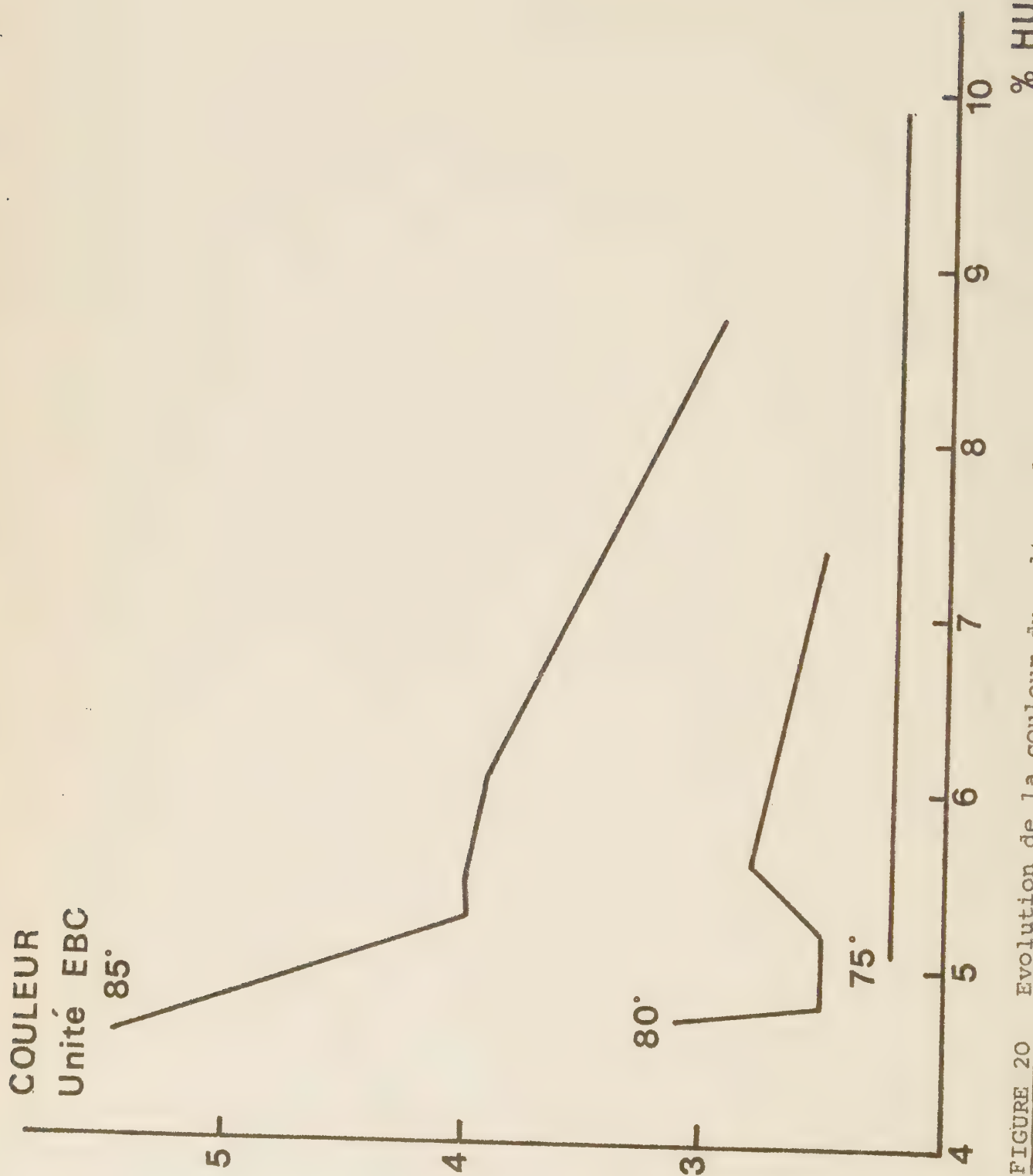


FIGURE 20 Evolution de la couleur (Unité EBC) en fonction de l'humidité (%) pour trois températures : 85°, 80° et 75°.

Les gradients d'augmentation de la couleur, de la surcoloration et de l'écart ($SC - C$) sont particulièrement évolutifs lorsque l'humidité d'équilibre du malt descend en dessous de 6 % environ. C'est justement le degré d'humidité que nous avons atteint à la fin de la première heure de coup de feu.

Dans le milieu peu hydraté comme le malt où dominant les polysaccharides comme l'amidon (60 %), le rôle de l'eau sur les transformations biochimiques s'explique plus par son niveau d'activité que par sa concentration en valeur absolue.

Ainsi, ce seuil de l'humidité voisin de 6 % que nous avons observé, correspond au point d'inflexion inférieur de la courbe de sorption du malt établie par SFAT (1965) et pour une valeur d'humidité relative de l'air d'équilibre de 25 %.

Il faut noter que cette courbe de sorption de SFAT établie pour une zone de température de 60 à 93°C n'est pas rigoureuse au sens stricte, cela s'explique aisément, car il est très difficile d'établir expérimentalement en laboratoire cette courbe à des températures élevées de 70, 80 ou 85°C.

Nous savons par ailleurs que pour une température de 20°C où la courbe de sorption est connue rigoureusement*, cette zone de 5 à 6 % d'humidité du malt est également une zone critique de la courbe de sorption du malt (Fig. 23).

Cette zone d'inflexion dans le diagramme de sorption correspond au passage de l'eau fortement "liée" aux macro-molécules par liaison hydrogène à une eau chimiquement moins liée sans toutefois être déjà solvante.

ette courbe de sorption a été établie expérimentalement par le Laboratoire de physicochimie des Céréales de l'I.N.R.A. à Massy (93305)

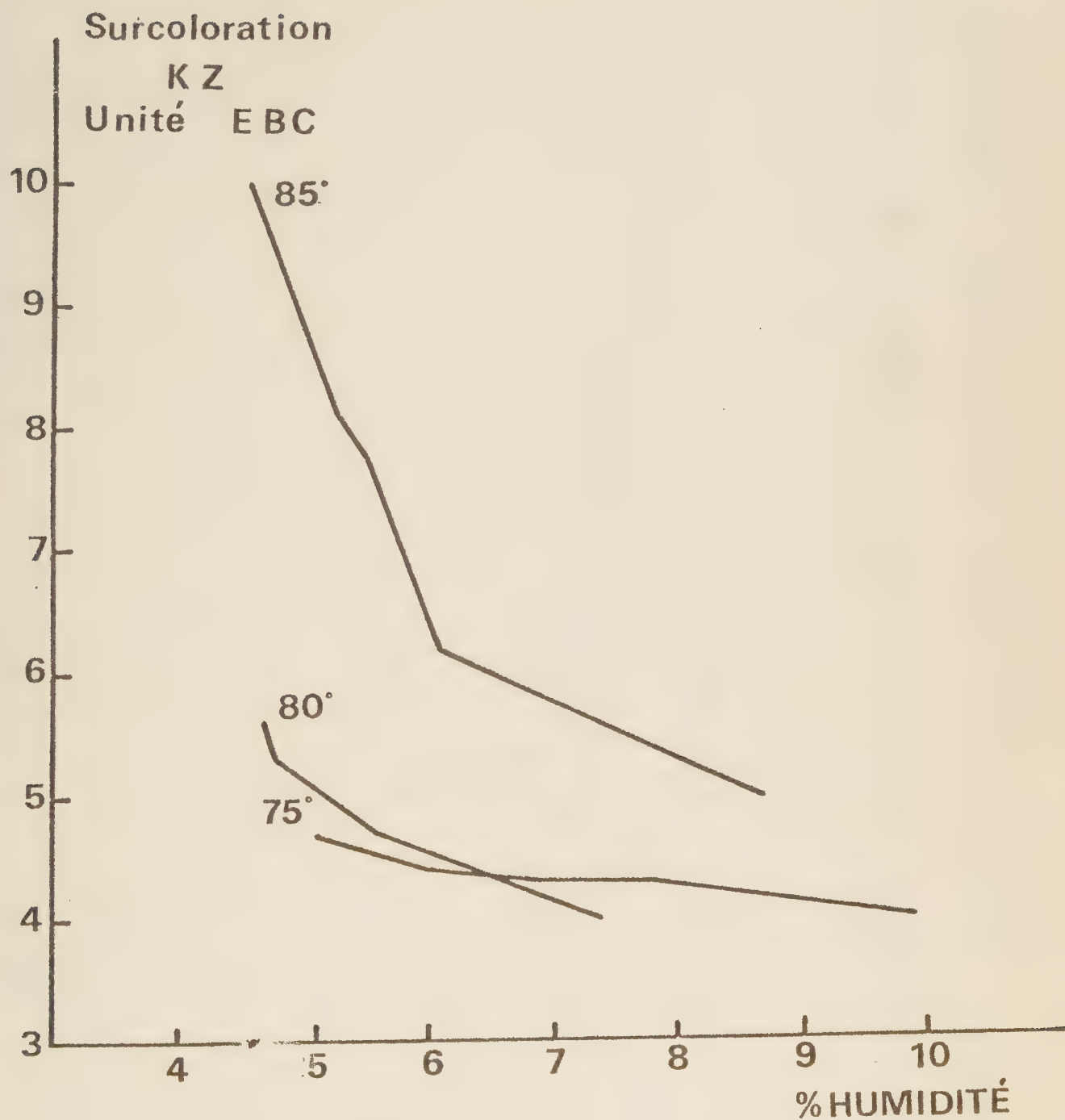


FIGURE 21

Evolution de la surcoloration KZ du malt en fonction de l'humidité du malt prélevé au cours du coup de feu à différentes températures (75, 80, 85°C)

85°

80°

75°

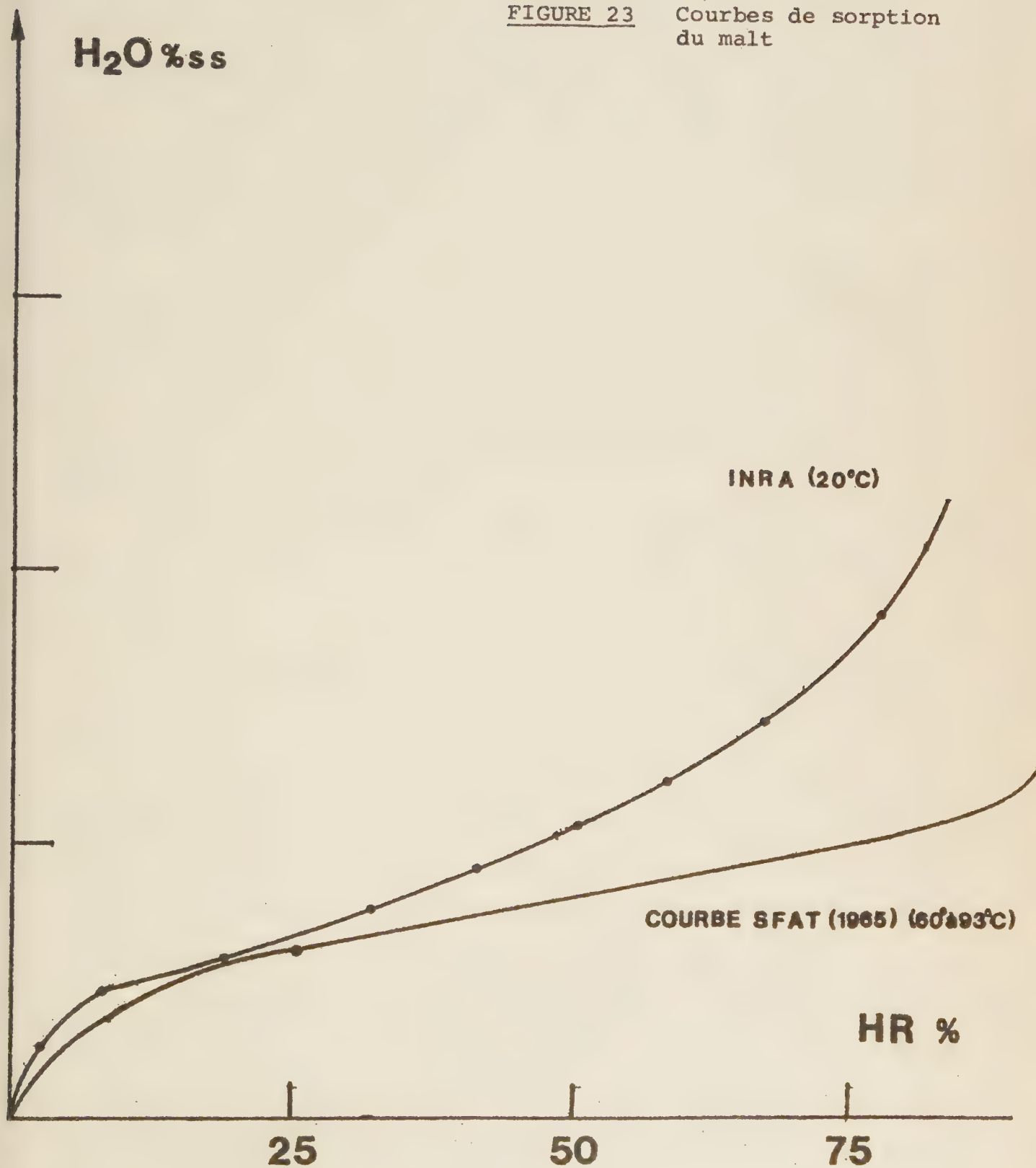
% HUMIDITE

Evolution de l'écart (surcoloration KZ-couleur) en fonction de l'humidité du malt prélevé au cours du coup de feu à différentes températures (75, 80, 85°C)

FIGURE 22

SORPTION MALT

FIGURE 23 Courbes de sorption
du malt



Les travaux de LEA et HANNAN (1949), LONCIN et al. (1965) et BIMBENET (1969) ont montré que la vitesse des réactions de Maillard passait par un maximum dans les milieux modèles pour des valeurs d'humidité relative de l'air d'équilibre située entre 40 et 60 %, ce qui correspondrait à une humidité d'équilibre du malt voisin de 10 %.

Dans le milieu complexe qu'est le malt, nous n'observons pas la même chose et nous mettons en évidence une autre zone critique au coup de feu qui nous apparaît très importante.

Tout malteur sait, en outre, que pour une humidité relative de l'air bien supérieure à 60 %, ce qui correspond dans le malt vert à la présence d'eau "solvante" et à la période de séchage, proprement dite, la formation de constituants générateurs de couleur peut être très rapide grâce aux activités enzymatiques : cela est utilisé pour la fabrication des malts spéciaux.

Toutes ces données revêtent un grand intérêt pratique pour le malteur.

1.2.2. Evolution du pouvoir réducteur et des réductones

La détermination du pouvoir réducteur, très important sur le plan technologique en brasserie, peut être un bon critère pour suivre l'allure des réactions de brunissement. En effet, au cours de ces réactions, la destruction des molécules des sucres s'accompagne de la formation de molécules d'un pouvoir réducteur plus élevé.

Par exemple, au début des réactions de Maillard, les aminocétoses formés par le réarrangement d'Amadori, donnent une réaction positive avec les indicateurs rédox. Plus tard, la dégradation de ces aminocétoses peut conduire à la formation des réductones et des aminoréduc-

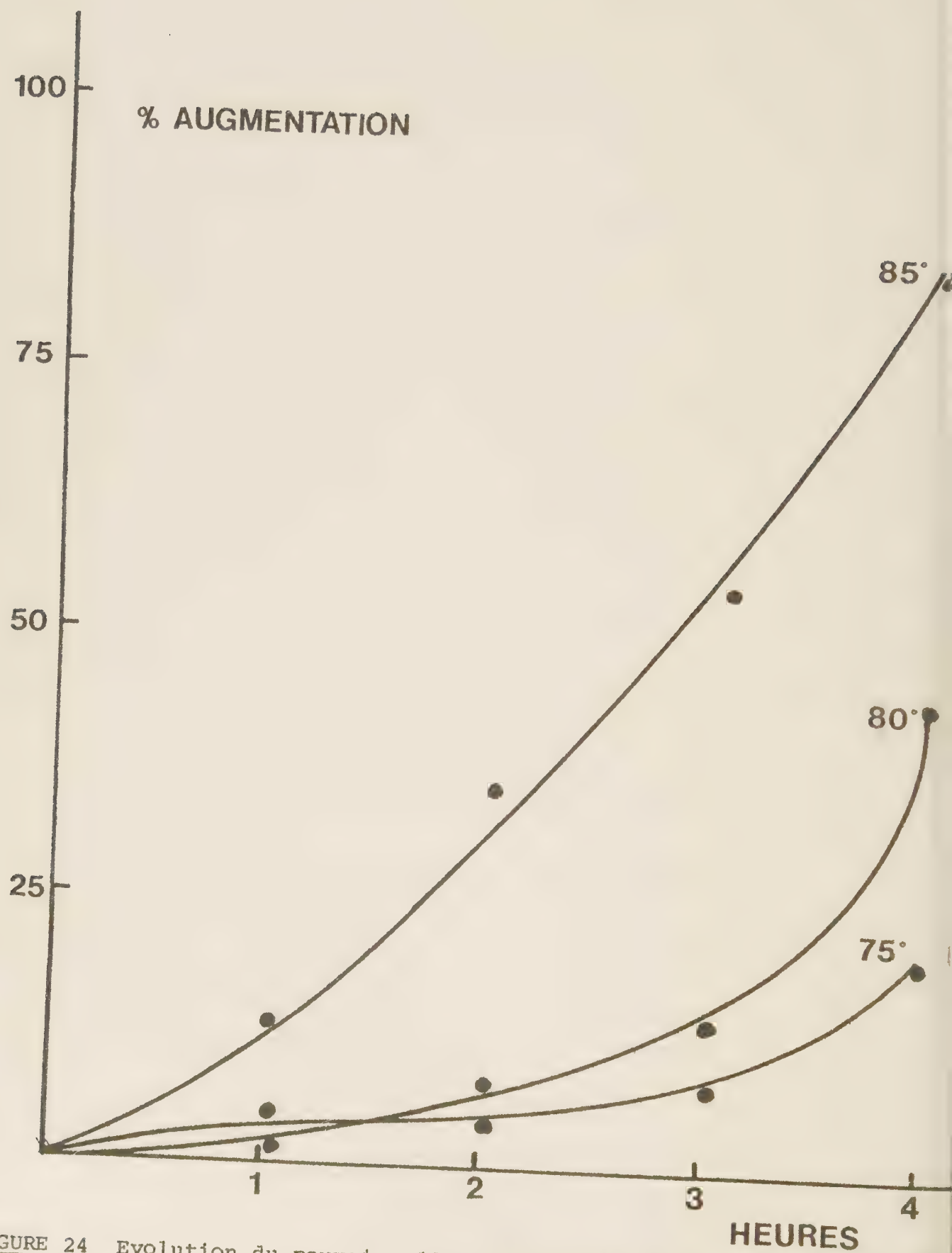


FIGURE 24 Evolution du pouvoir réducteur de malt au cours du coup de feu pour trois niveaux de températures

tones. Ces substances fort réductrices peuvent également se former lors de la dégradation thermique des oses.

Sur le plan technologique, le rôle des réducteurs sur la stabilité colloïdale et la stabilité organoleptique de la bière est incontestable.

La méthode ITT couramment utilisée en industrie brassicole ne donne pas d'indications suffisamment précises sur les réducteurs. Nous avons alors fait appel à d'autres méthodes pour cette étude. La méthode de MITSUDA (1958) pour le dosage des réductones et la méthode de ADACHI (1958) pour la détermination du pouvoir réducteur ont été retenues après quelques modifications.

Ces méthodes colorimétriques sont peu connues dans notre industrie brassicole, mais elles sont couramment utilisées dans l'étude des réactions de brunissement en industrie alimentaire. Citons à titre d'exemple, les travaux de ADACHI (1958), de KATO et al. (1968), OKUHARA et SAITO (1970 et de HASHIBA (1973).

Les dosages effectués sur des moûts conventionnels révèlent l'augmentation progressive du pouvoir réducteur et du taux des réductones au cours du coup de feu. Le paramètre température y joue encore un rôle prépondérant (Fig. 24 à 25).

Si l'on compare ces courbes avec celles de l'évolution de la couleur et de la surcoloration (Fig. 14 et 15), l'analogie est très significative. Là encore, on observe une évolution particulière lorsque la température du coup de feu passe de 80 à 85°C.

Nous avons noté une augmentation de pouvoir réducteur de 85 environ pendant le coup de feu à 85°C, alors que à 80°C, au bout de 4 heures de coup de feu, le pouvoir réducteur n'augmente que de 40 %; à 75°C, l'évolution est bien plus lente encore et on n'observe qu'un accroissement de 20 % (Fig. 26).

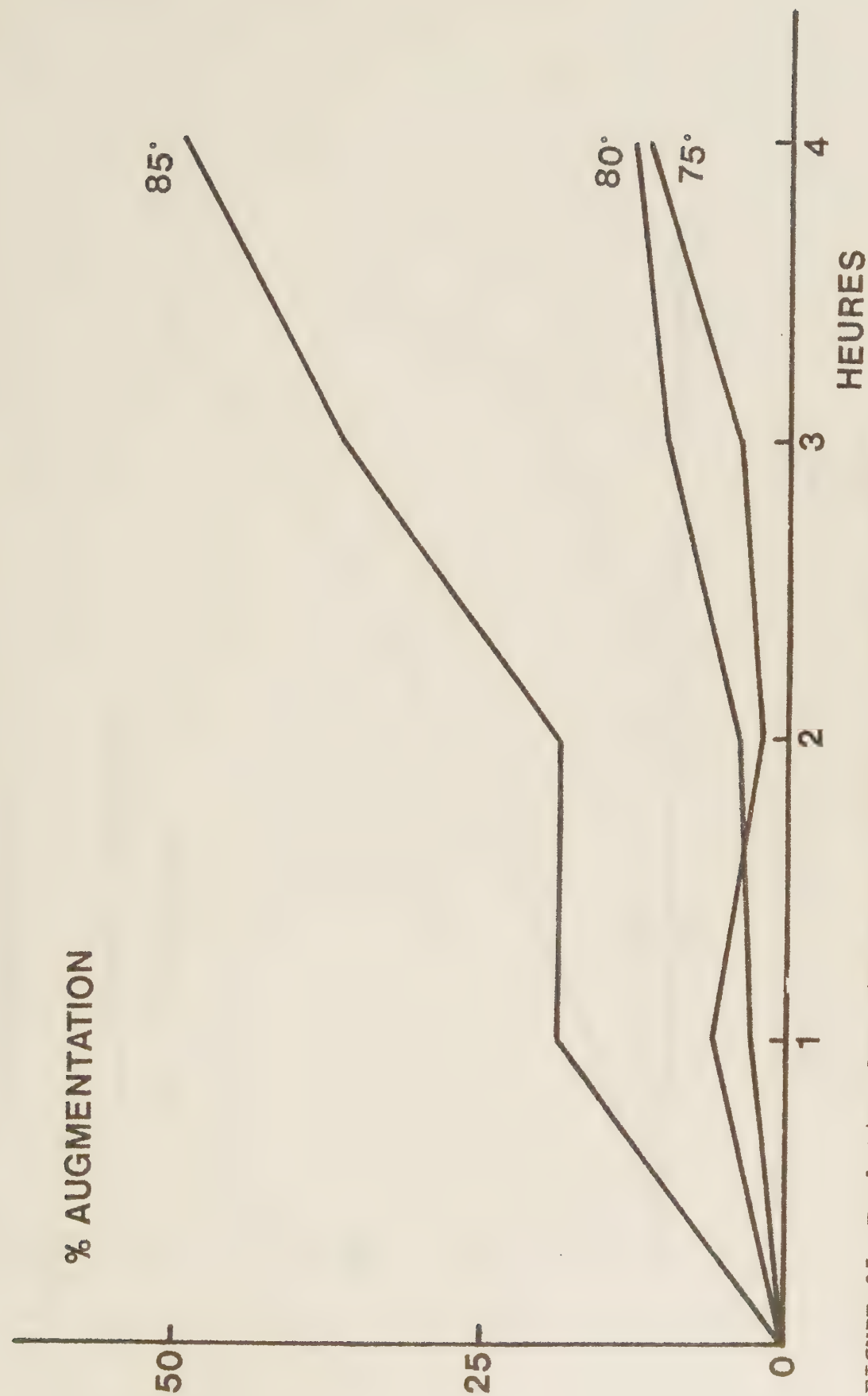


FIGURE 25 Evolution des réductones du malt au cours du coup de feu pour trois niveaux de températures (75, 80, 85°C)

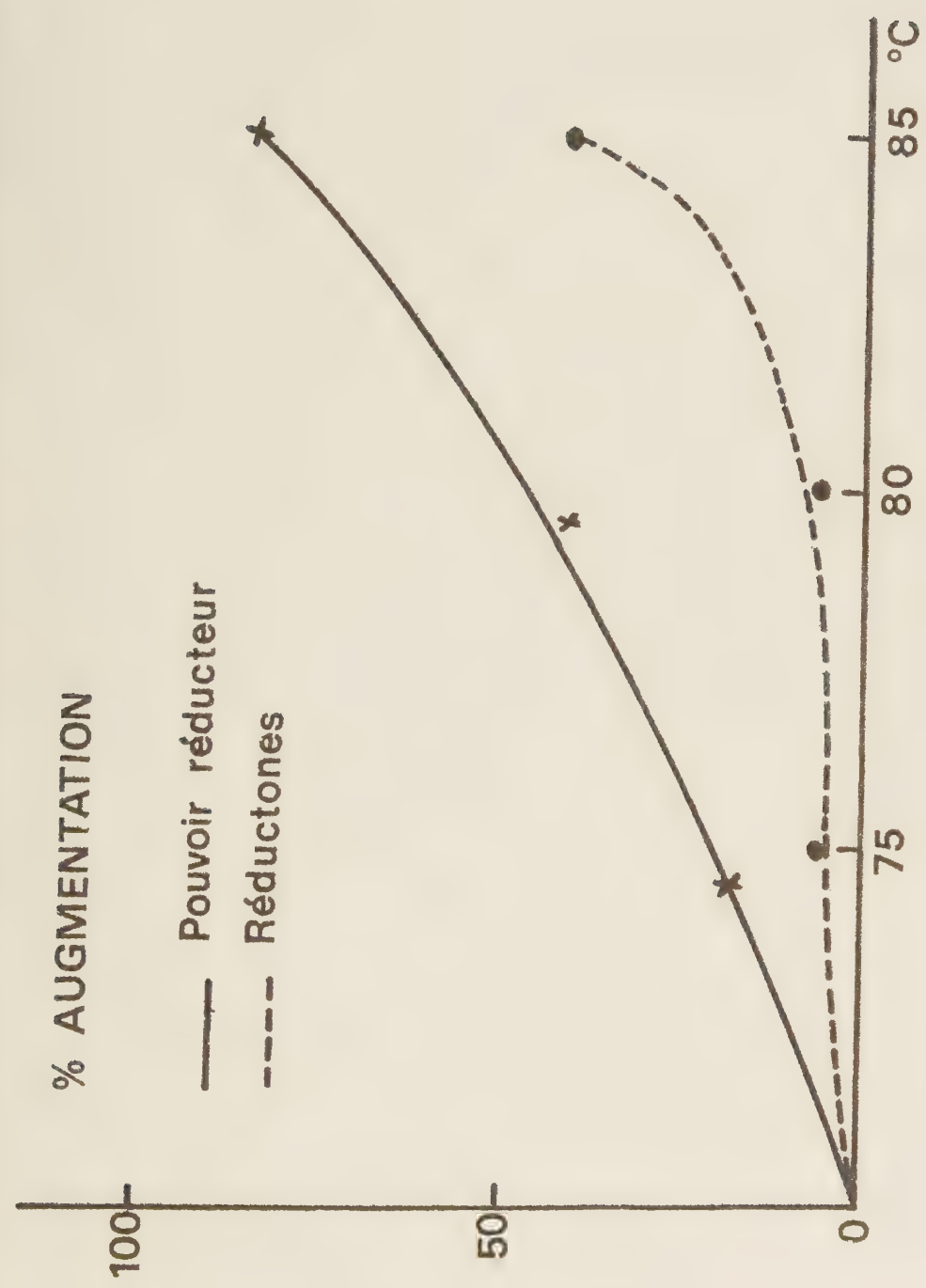


FIGURE 26 Evolution du pouvoir réducteur et des réductones du malt en fonction de la température du coup de feu

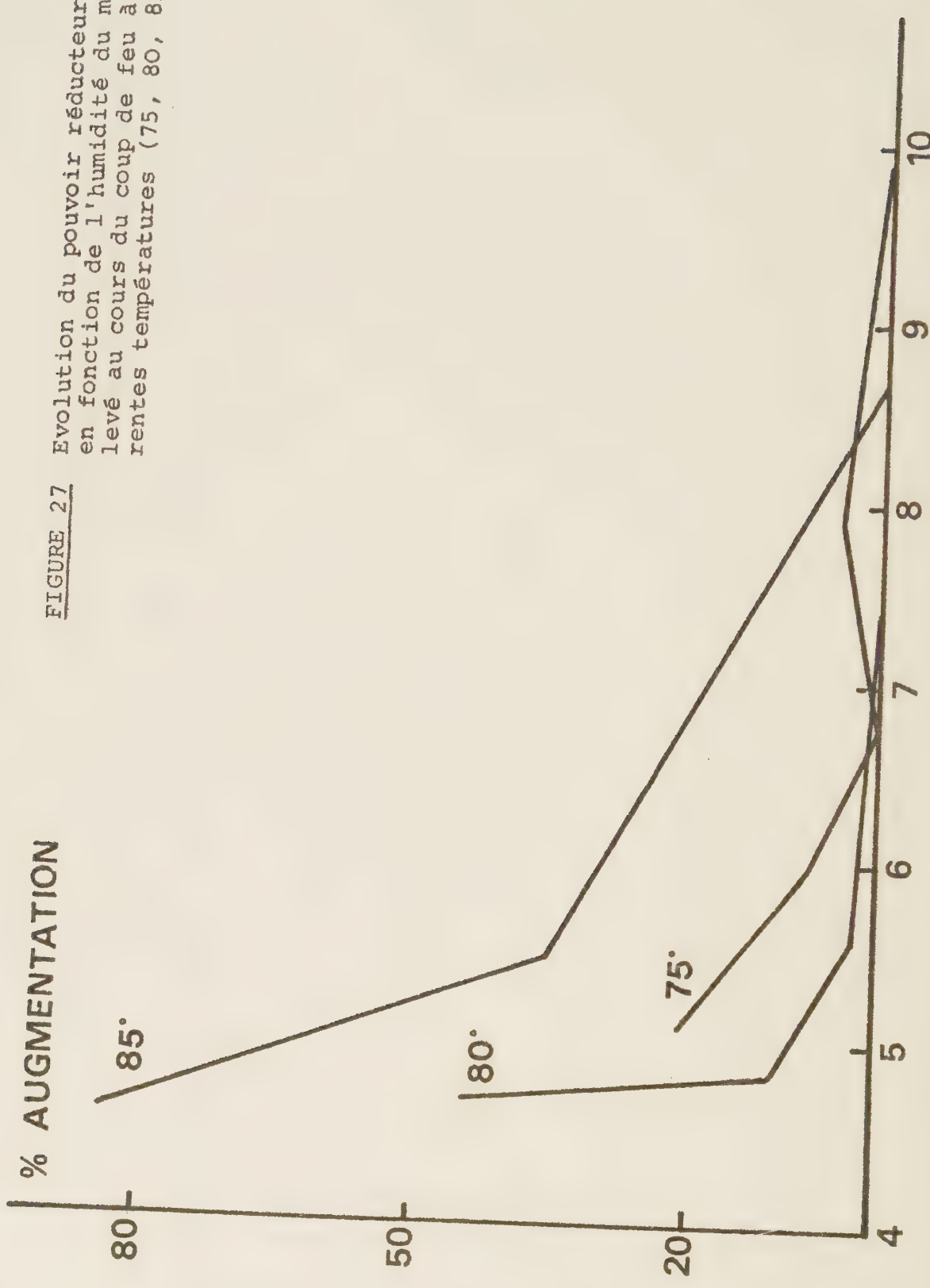


FIGURE 27

Evolution du pouvoir réducteur du malt en fonction de l'humidité du malt prélevé au cours du coup de feu à différentes températures (75, 80, 85°C)

L'évolution des réductones suit à peu près la même allure.

Nous avons également suivi l'évolution de ces deux critères en fonction de l'humidité du malt (Fig. 27 et 28). Ces courbes montrent une fois encore l'intensité particulière des réactions de brunissement en dessous de 6 % d'humidité, zone critique de la courbe de sorption signalée plus haut.

1.2.3. Evolution des acides aminés et des glucides

Puisque les réactions de Maillard implique la destruction d'acides aminés et d'oses, il a été indispensable de suivre l'évolution de ces deux groupes de substances au cours du coup de feu.

Pour supprimer toute interférence enzymatique, les dosages ont été effectués sur des extraits aqueux préparés à froid (0°C).

Nous exposons les résultats concernant les acides aminés libres dans les figures (29), (30) et (31).

Les histogrammes de la figure (29) montrent l'évolution de chaque acide aminé au coup de feu à 75°C.

Pendant la première heure, la température étant favorable, l'activité enzymatique se poursuit dans le malt vert qui contient encore 10 % d'humidité : résultat, une augmentation des teneurs en acides aminés de l'ordre de 6 % en moyenne durant cette période. Ensuite, nous constatons une diminution progressive tout au long du coup de feu. C'est ainsi qu'on ne retrouve que 80 % en moyenne d'acides aminés du malt vert séché dans le malt à la fin du coup de feu.

Par ailleurs, à l'examen de ces histogrammes, on peut observer que presque tous les acides aminés du malt offrent un comportement uniforme dans les réactions de Maillard qui se déroulent au coup de feu à 75°C.

.../...

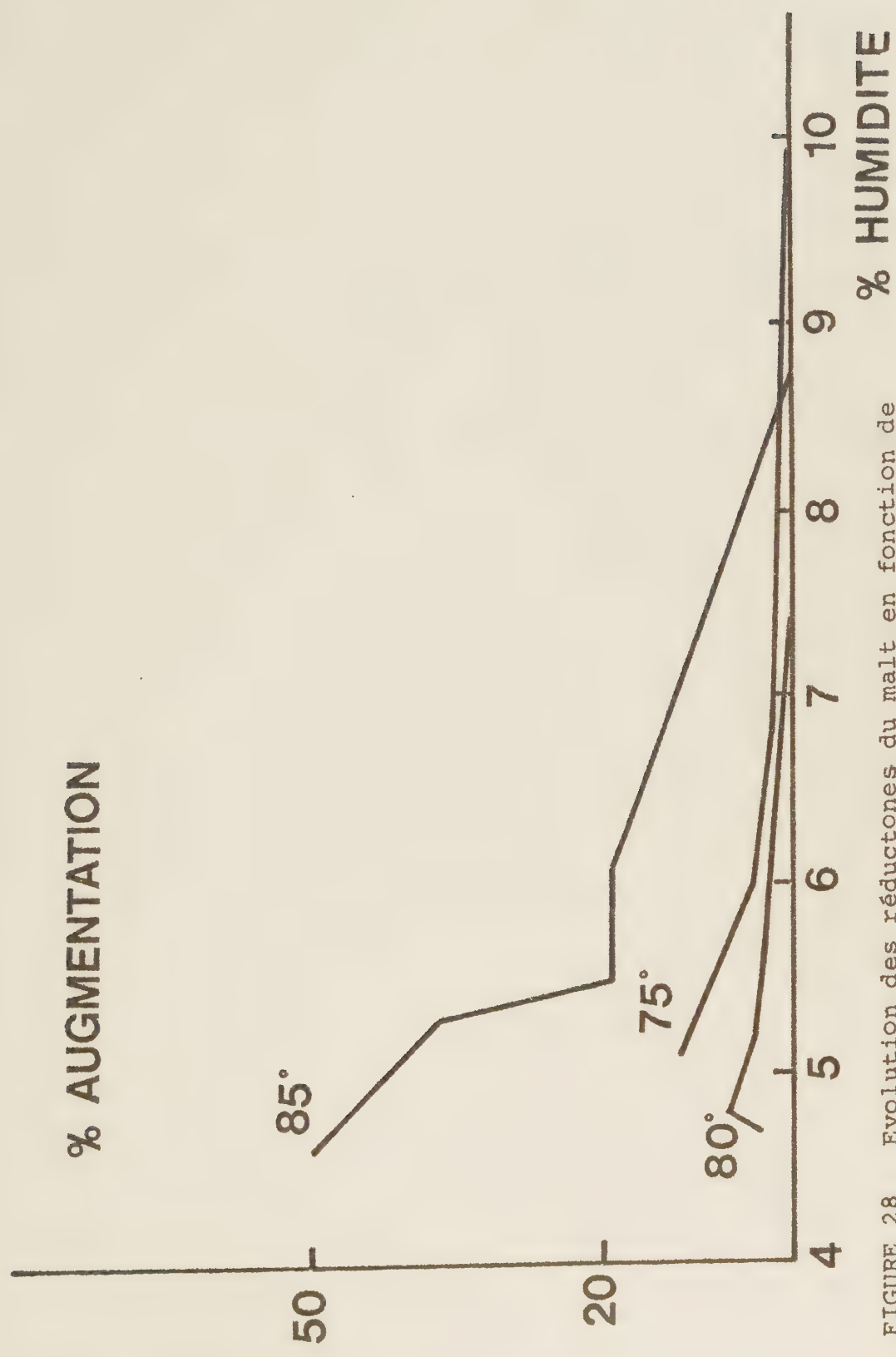


FIGURE 28 Evolution des réductions du malt en fonction de l'humidité du malt prélevé au cours du coup de feu à différentes températures

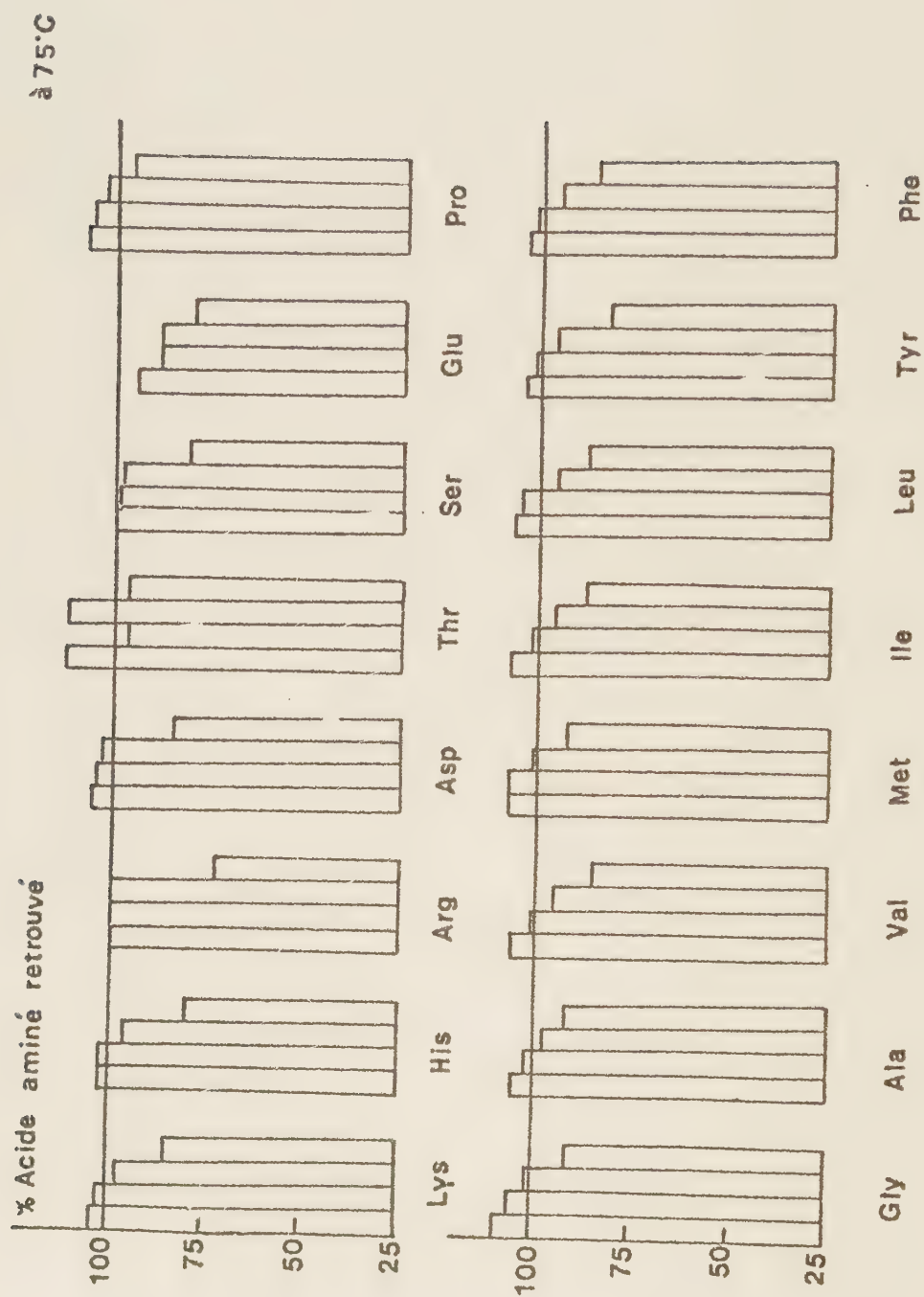


FIGURE 29 Evolution des acides aminés libres du malt pendant le coup de feu à 75°C

Lorsque nous avons monté la température de coup de feu à 80°C, la destruction des acides aminés a été plus marquée (Fig. 30). On note une baisse progressive dès le début de coup de feu. La valeur moyenne de diminution est de l'ordre de 25 %.

Les acides aminés basiques (histidine, arginine et lysine), la thréonine, la sérine, le glyocolle et l'isoleucine paraissent les plus sensibles avec un taux de destruction de 25 à 35 %. Par contre, l'acide glutamique et la proline sont les acides aminés les moins endommagés par le coup de feu à 80°C.

L'évolution des acides aminés du malt pendant le coup de feu à 85°C a été présentée par les histogrammes de la figure (31).

La destruction des acides aminés devient considérable à cette température. En effet, nous notons une diminution de plus d'un tiers des teneurs en acides aminés du malt vert séché pendant le coup de feu. Même pour certains d'entre eux, le taux de destruction dépasse 40 %. C'est le cas de l'histidine (46 %), de la thréonine (43 %). La teneur en proline n'évolue guère, une diminution de l'ordre de 9 % a été enregistrée.

Nous avons ensuite étudié l'évolution des sucres principaux du malt tels que fructose, glucose, saccharose, maltose et maltotriose durant le coup de feu.

La figure (32) où nous présentons les résultats du coup de feu à 75°C montre qu'il y a une diminution progressive de la teneur en maltose, alors que les teneurs en fructose et en glucose (ces sucres sont en principe très réactifs dans les réactions de Maillard) ne diminuent que très légèrement. Le saccharose reste pratiquement inchangé.

Les résultats obtenus par un coup de feu à 80°C sont rassemblés dans la figure (33). Nous notons une nette diminution du fructose

a 80°C

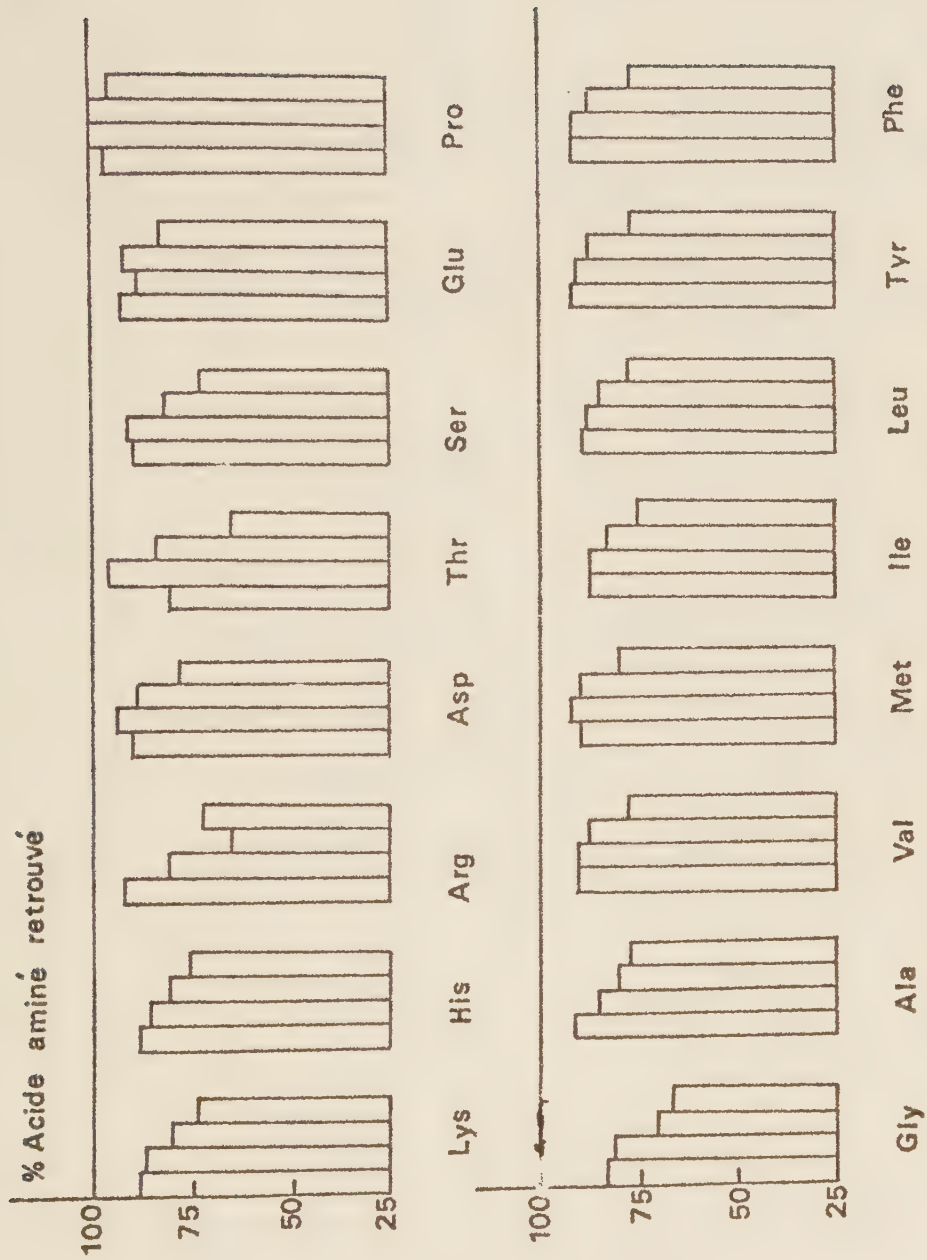


FIGURE 30 Evolution des acides aminés libres pendant le coup de feu à 80°C



à 85°C

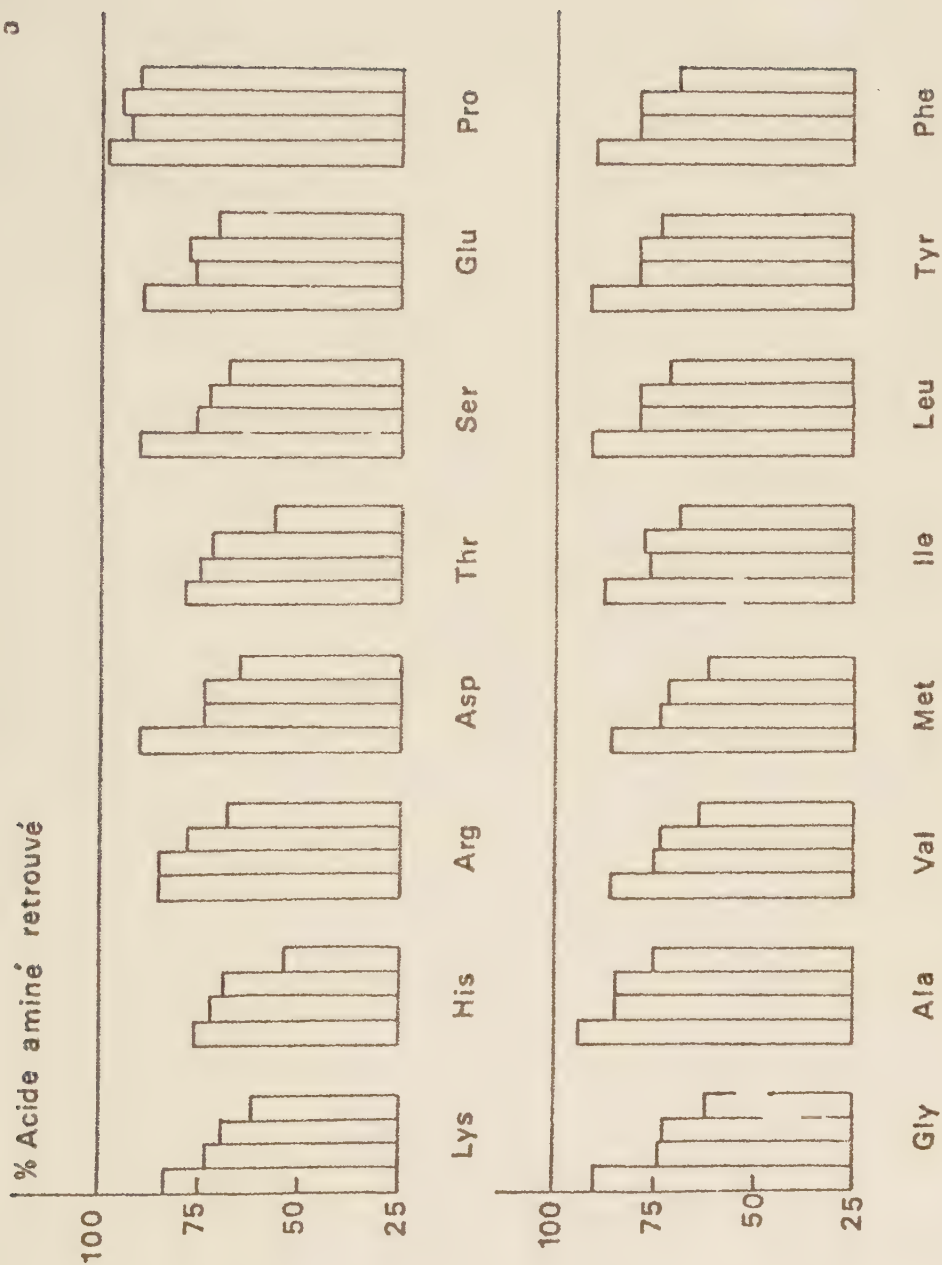


FIGURE 31 Evolution des acides aminés libres du malt pendant le coup de feu à 85°C

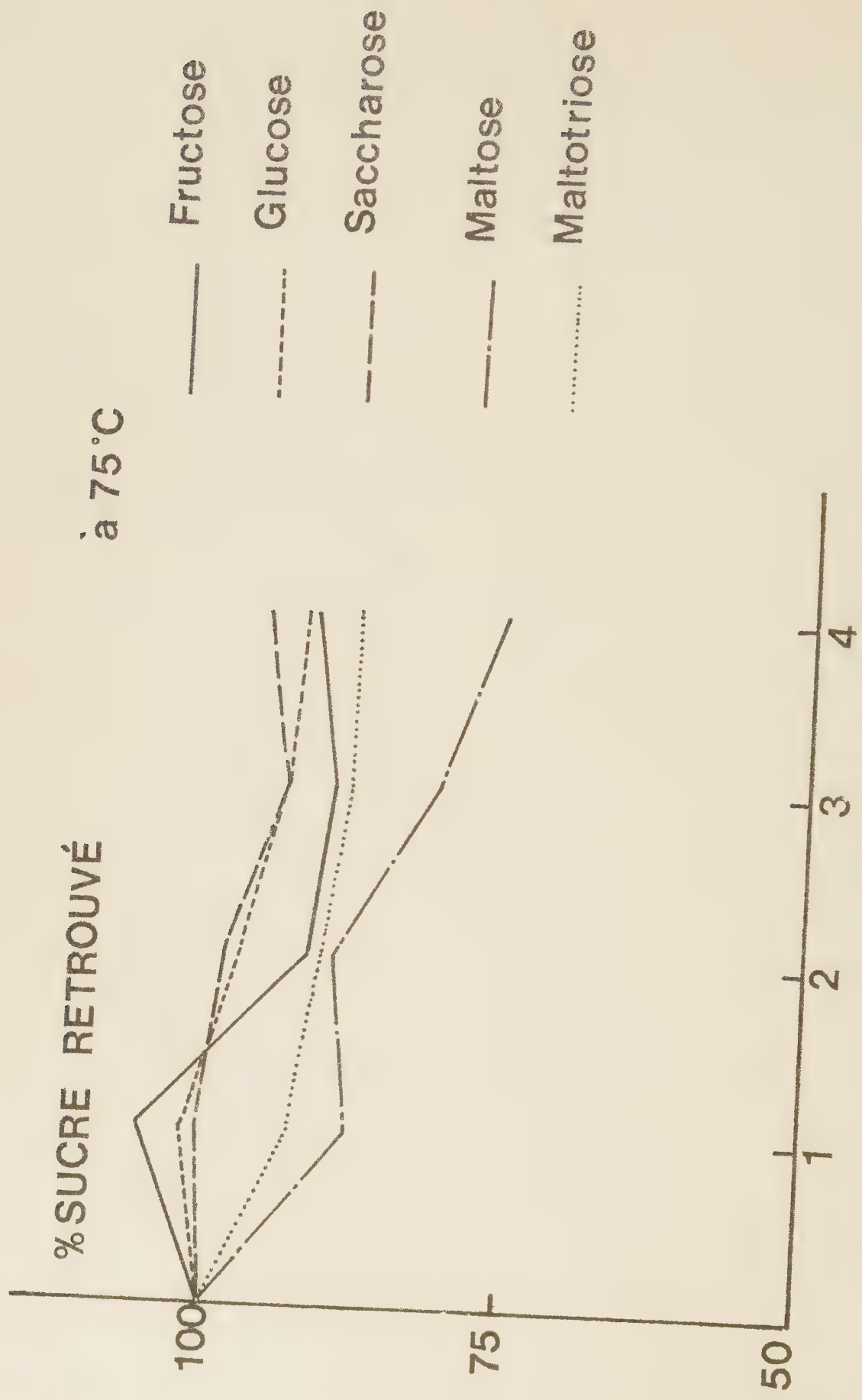


FIGURE 32 Evolution des oses simples du malt au cours du coup de feu à 75°C

glucose et maltose. Le saccharose présente une évolution particulière. On observe une augmentation progressive de la teneur en ce sucre du malt au coup de feu.

D'autre part, le taux du maltotriose n'évolue que très peu. Les diminutions importantes des teneurs en fructose et en glucose ont été également enregistrées pendant le coup de feu à 85°C (Fig.34).

L'évolution du maltose est assez intéressante, on note une libération du maltose pendant les deux premières heures du coup de feu, ensuite une diminution.

Les courbes d'évolution du saccharose et du maltotriose présentent également des allures particulières. Pour le saccharose, on note une légère baisse suivie d'une augmentation progressive alors que la teneur en maltotriose reste pratiquement inchangée jusqu'à la dernière heure du coup de feu et augmente ensuite.

Afin de pouvoir comparer l'évolution des différents sucres pour différentes températures de coup de feu, nous avons tracé les courbes du pourcentage de sucre retrouvé dans le malt touraillé en fonction de la température de coup de feu (Fig. 35).

Les taux de glucose et de fructose du malt diminuent en fonction de la température de coup de feu. En ce qui concerne les autres sucres on observe des variations assez intéressantes. D'après la courbe du maltose, on peut noter que lorsque la température du coup de feu augmente, on retrouve plus de maltose dans le malt touraillé. C'est également le cas du maltotriose.

Ces résultats démontrent que la destruction des oses due aux réactions de Maillard, n'est pas seule à intervenir sur la composition du malt en sucres simples pendant le coup de feu.

% SUCRE RETROUVE à 80°C

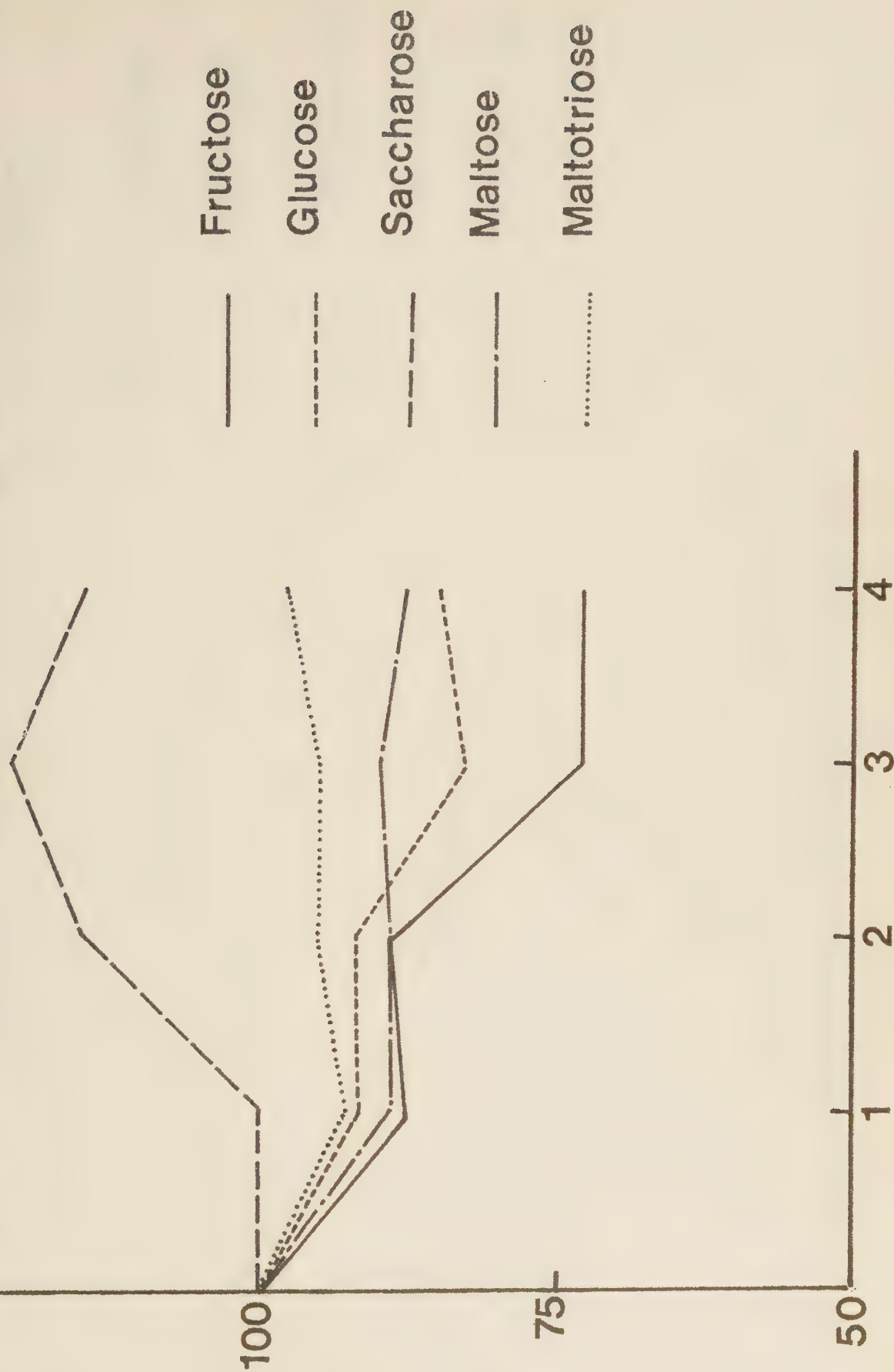


FIGURE 33 Evolution des oses simples du malt au cours du coup de feu à 80°C

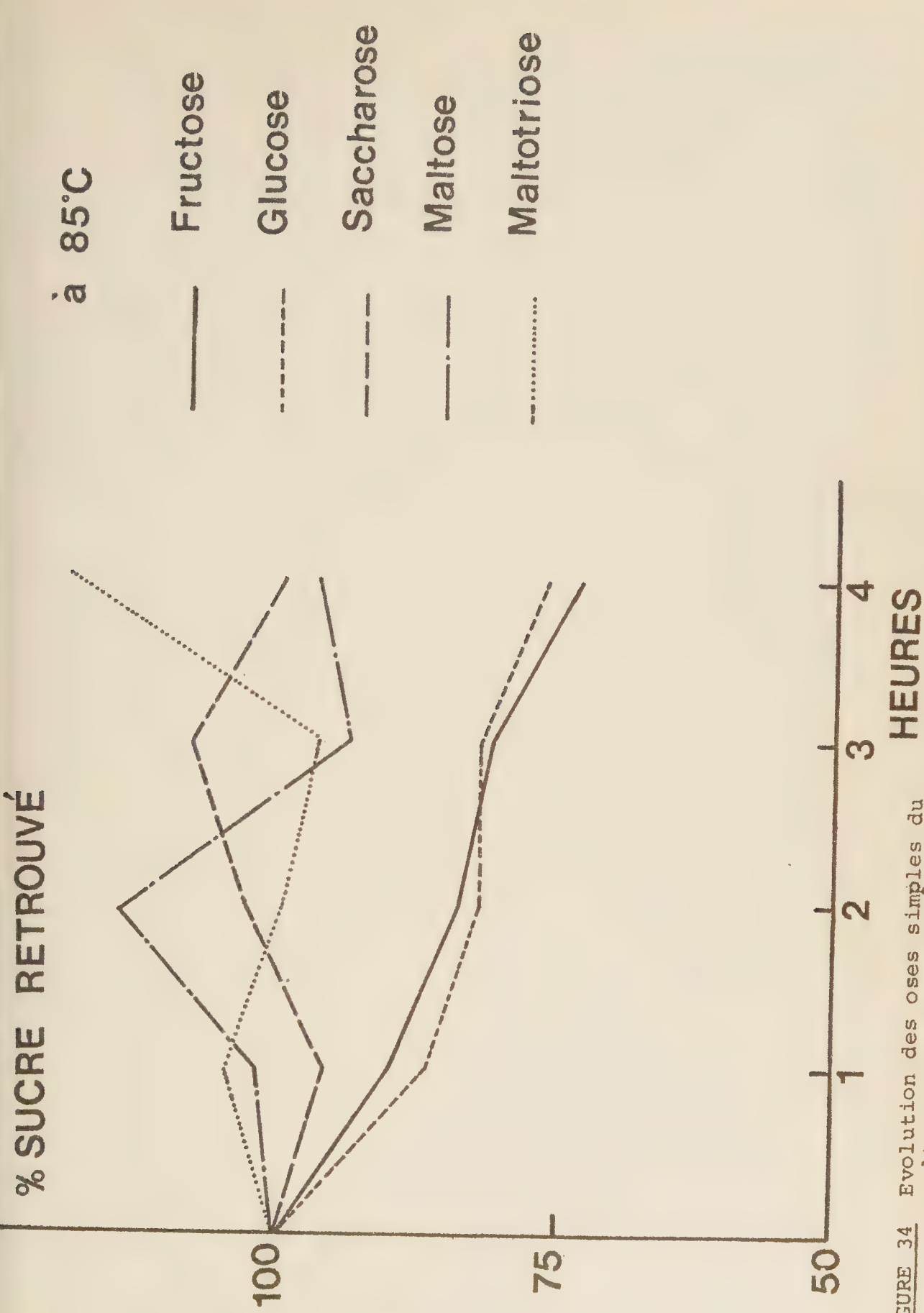


FIGURE 34 Evolution des oses simples du malt au cours du coup de feu à 85°C

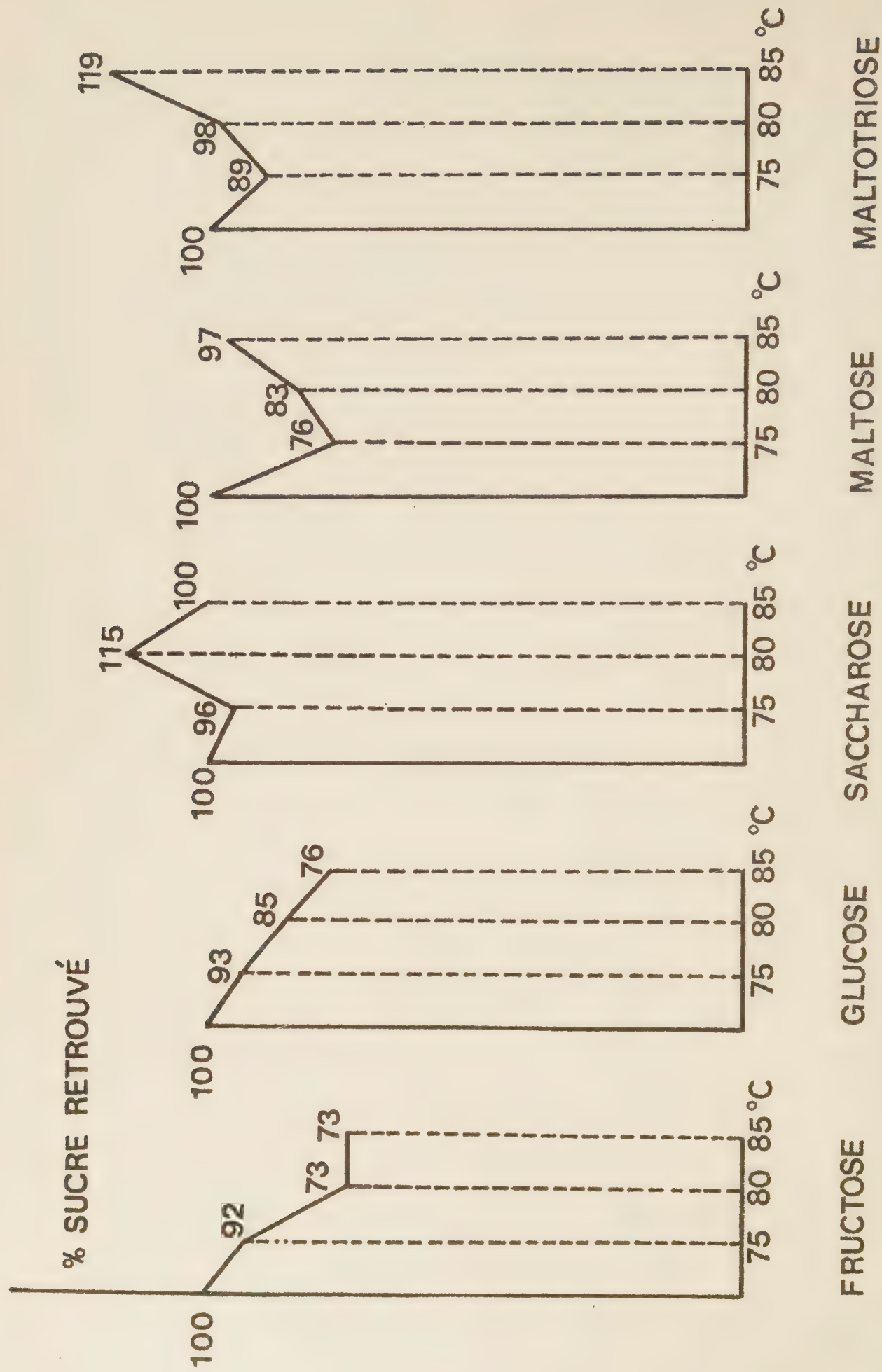


FIGURE 35 Evolution des oses simples du malt en fonction de la température de coup de feu

Compte tenu des conditions de température et d'humidité présentes, les augmentations des teneurs en certains sucres observées notamment durant les premières heures du coup de feu ne peuvent être expliquées que par des réactions enzymatiques en milieu peu hydraté.

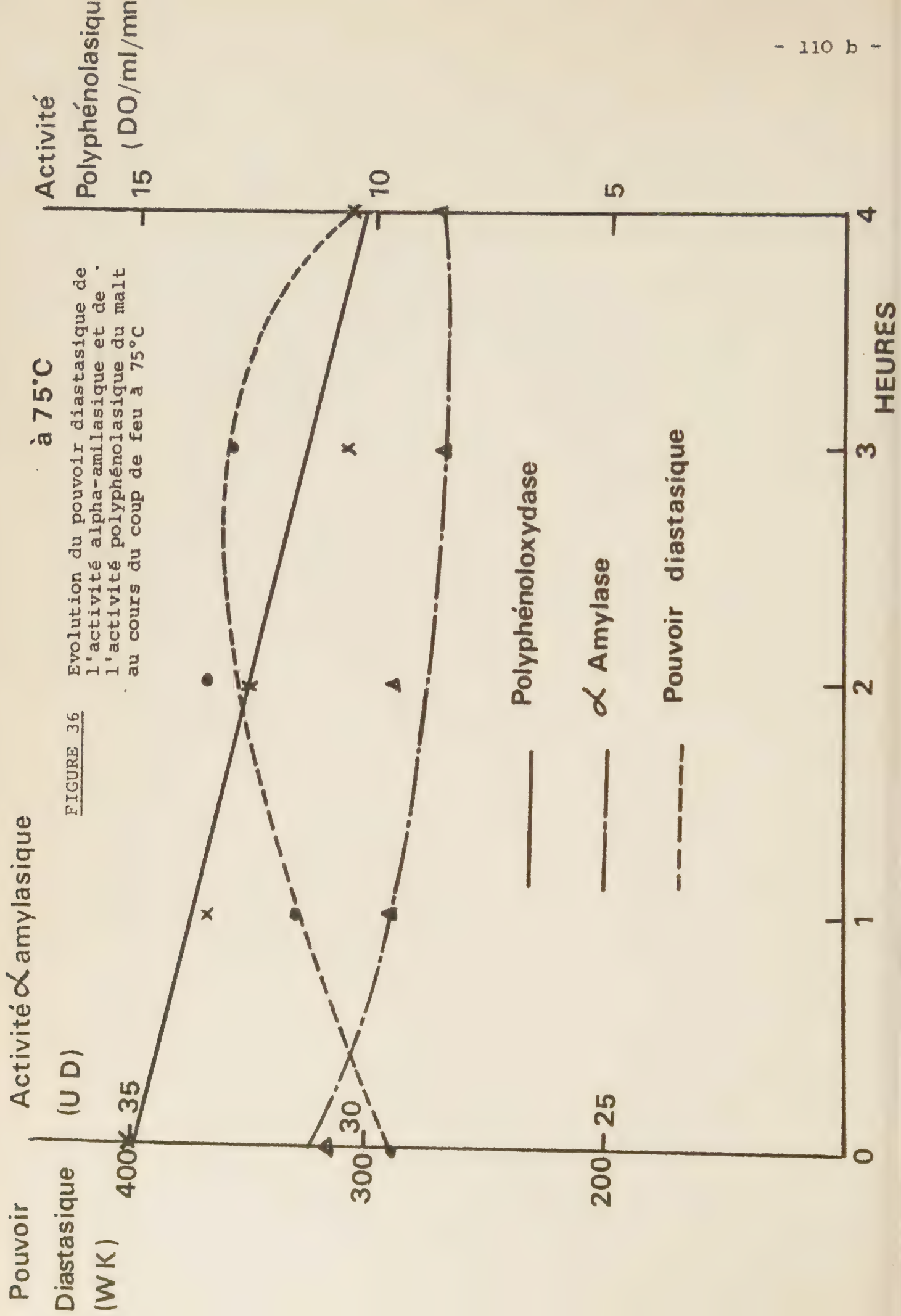
En effet, pendant cette période, l'humidité du malt descend d'une valeur de 10 % jusqu'à 5,5 % environ. Cela correspond dans la courbe de sorption du malt établie par SFAT (1965) à une zone d'humidité relative de 75 à 20 %, ce qui nous révèle la présence d'eau réactive dans le malt au début du coup de feu.

Les travaux de DRAPRON et GUILBOT (1962 a et b) sur la dégradation de l'amidon par les amylases en fonction de l'activité de l'eau en milieu peu hydraté, ont montré que dans cette zone de l'humidité relative, l'amylolyse peut avoir lieu, mais dans une mesure très restreinte. Cependant, il faut préciser que ces auteurs ont effectué leurs expériences à des températures bien inférieures (21 et 31°C) aux températures optima des amylases, par contre, nos conditions de température sont situées dans une zone plus favorable à l'action de ces enzymes.

Signalons à ce sujet, une particularité des réactions enzymatiques en milieu peu hydraté : d'après ACKER (1962), la température optima d'une enzyme peut se déplacer en fonction de l'humidité du milieu, en effet, lorsque l'humidité du milieu diminue, cette température se déplace vers des valeurs plus élevées.

D'autre part, les travaux de DRAPRON et GUILBOT (1962) ont montré que l'action de l'*alpha*-amylase sur l'amidon en milieu peu hydraté est sensiblement différente de celle observée en solution.

En milieu peu hydraté, les produits libérés par l'*alpha*-amylase au début de l'hydrolyse sont : du glucose, du maltose et du maltotriose, alors qu'en solution aqueuse, ce sont surtout des oligo-



sides à chaîne relativement longue qui apparaissent, la quantité de glucose formée au début étant pratiquement négligeable. Cette évolution particulière aux faibles hydratations est considérée comme témoignant d'une attaque enzymatique localisée dans une zone restreinte des chaînes d'anhydro-glucoses, en raison de la rigidité du milieu.

Enfin, dans le malt, les grains d'amidon ont été corrodés par les amylases durant la germination et cette corrosion a facilité d'autant mieux une attaque enzymatique ultérieure au coup de feu.

1.2.4. Evolution de quelques activités enzymatiques

L'étude de l'évolution de quelques activités enzymatiques du malt pendant le coup de feu a été jugée nécessaire d'une part pour son rapport avec le point précédent, d'autre part, pour son intérêt pratique sur le plan technologique.

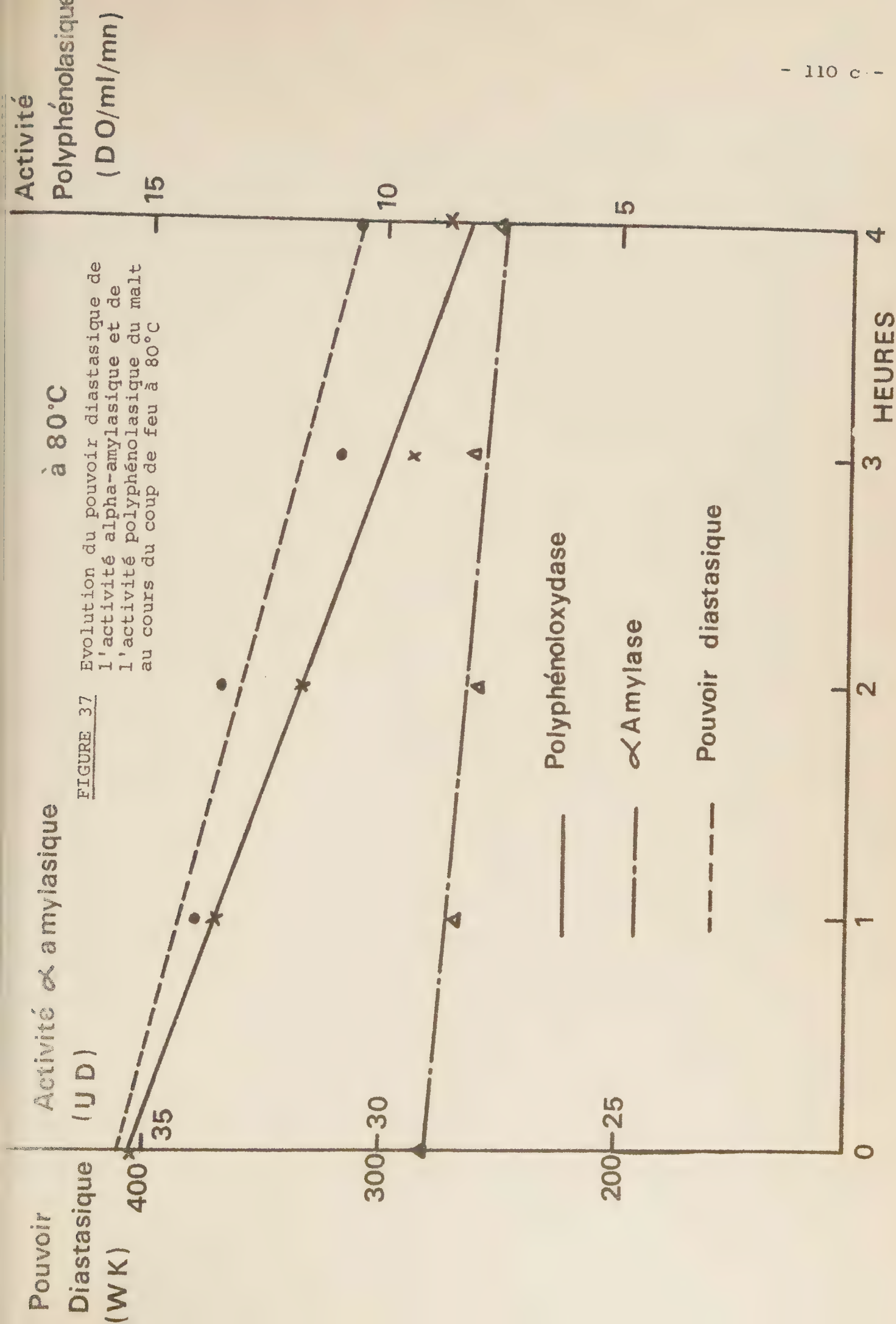
Nous avons suivi l'évolution du pouvoir diastasique (WK), de l'activité *alpha*-amylasique et de l'activité polyphénoloxidasique du malt.

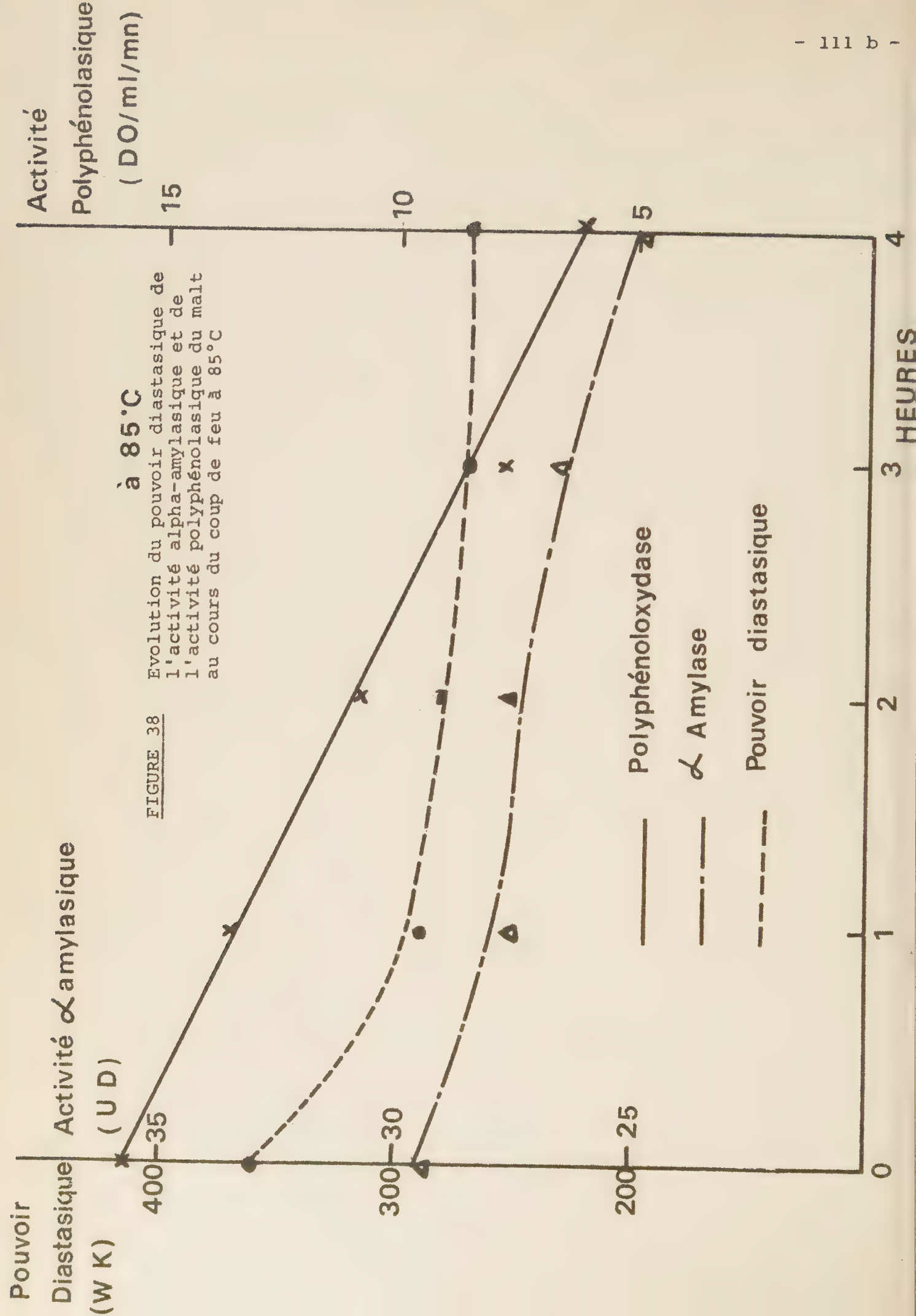
Au coup de feu à 75°C, nous n'avons pas observé une diminution considérable de l'activité *alpha*-amylasique, ni du pouvoir diastasique. Au contraire, ce dernier s'est développé pendant les deux premières heures du coup de feu, puis il a diminué très légèrement, mais la valeur finale atteinte est restée supérieure à la valeur initiale.

Quant à l'activité polyphénoloxidasique qui est très thermosensible, elle a baissé de 30 % environ pendant cette opération (Fig 36)

Avec l'augmentation de la température du coup de feu, on observe une inactivation plus accélérée des enzymes (Fig. 37, 38, 39).

L'*alpha*-amylase est la plus thermostable des enzymes du malt.





étudiées. En effet, on note une très légère disparition de son activité au cours du coup de feu à 80°C même à 85°C, ce qui confirme nos observations précédentes à propos de l'évolution des sucres du malt au coup de feu.

L'allure du pouvoir diastasique du malt pour ces deux températures de coup de feu est différente de celle qu'on a observé à 75°C. Il diminue progressivement dès le début du coup de feu. Le taux de diminution est à peu près du même ordre (25 %) pour les températures de 80 et 85°C.

La polyphénoloxydase est l'enzyme la plus endommagée, on note des baisses respectives de 40 et 60 % pour les températures de coup de feu de 80 et 85°C.

Certains auteurs, comme KLOPPER et DON (1961) ont tenté d'utiliser la baisse d'activité enzymatique au touraillage, comme celle de la catalase pour contrôler l'intensité du touraillage. Etant donné sa thermosensibilité, la polyphénoloxydase que nous avons déjà étudiée (SCRIBAN et DUPONT, 1973) pourrait être aussi une oxydase intéressante.

Quand on examine tous ces résultats expérimentaux, on constate que l'activité de ces oxydases peut être pour le malteur, un indice relatif de l'intensité du touraillage et du coup de feu en particulier mais ne sera jamais un indice absolu. En effet, la teneur en oxydases du malt dépend de nombreux facteurs agissant antérieurement au touraillage (variété, germination).

La qualité du malt en liaison avec l'intensité du touraillage doit être suivie sur d'autres critères.

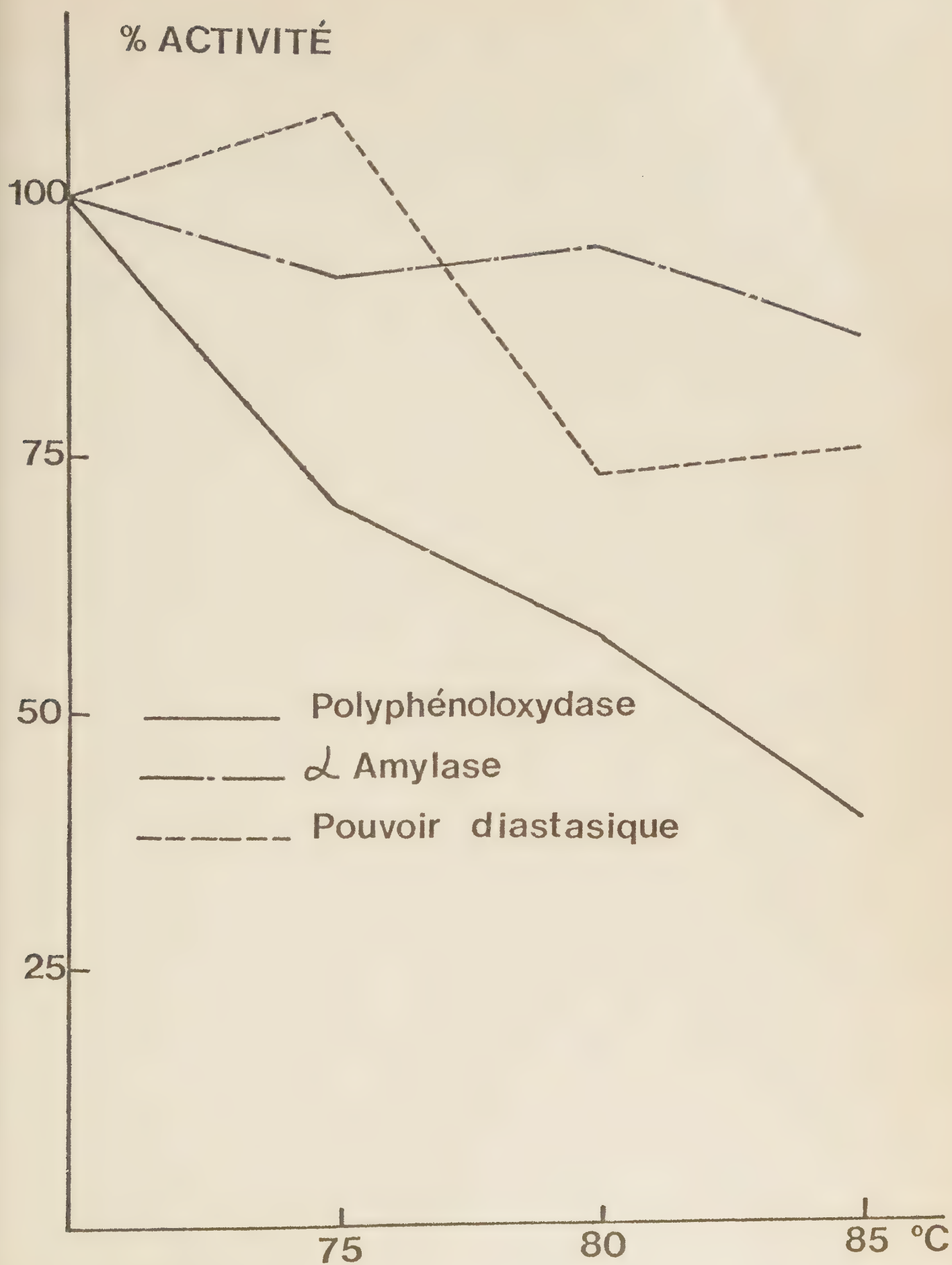


FIGURE 39 Influence de la température de coup de feu sur quelques activités enzymatique du malt

TABLEAU (V)

Variations relatives de différentes fractions
de cétose-amines au coup de feu

Température et temps du coup de feu		Fraction A	Fraction B	Fraction C	Moyenne
75°C	Début	100	100	100	100
	1 h	102	133	159	131
	2 h	100	149	127	125
	3 h	106	153	150	136
	4 h	102	168	210	160
80°C	Début	100	100	100	100
	1 h	93	130	140	121
	2 h	80	119	142	113
	3 h	91	155	124	123
	4 h	86	267	270	208
85°C	Début	100	100	100	100
	1 h	112	184	215	170
	2 h	114	183	184	160
	3 h	113	183	191	162
	4 h	125	267	301	231

1.2.5. Evolution relative des cétose-amines au coup de feu

Nous avons ensuite entrepris une étude sur les cétose-amines du malt par la technique de chromatographie sur échangeurs d'ions. Car, comme nous l'avons vu, ces substances jouent le rôle de plaque tournante dans le déroulement des réactions de Maillard.

Dans une première phase, nous avons suivi leur évolution en fonction du temps, de la température et de l'humidité du malt pendant le coup de feu.

En tenant compte du travail de YOSHIDA et al. (1972), les teneurs relatives ont été calculées à partir des surfaces des pics apparus à la chromatographie juste avant celui de l'acide aspartique sur le diagramme de l'auto-analyseur d'acides aminés dans les conditions normales d'analyse.

Comme la figure (40) nous le montre, les cétose-amines du malt donnent trois pics principaux que nous nommerons A, B et C sur le diagramme. Il est probable que chacune de ces trois fractions comporte plusieurs cétose-amines. En effet, les travaux de YOSHIDA et al. (1972) ont montré que la fraction C qui correspond à leur fraction A.II, contenait cinq constituants dont ils en ont identifié trois : valino-deoxy-fructose, alanino-deoxy-fructose et glycino-deoxy-fructose.

Les variations relatives de ces trois fractions pendant nos essais de coup de feu sont rassemblées dans le tableau (V).

On constate une évolution relativement légère de la fraction A. Alors que les teneurs relatives des fractions B et C augmentent considérablement au cours de nos essais de coup de feu : en effet, elles sont triplées à 80° et à 85°C.

Thr+Ser

- 112 c -

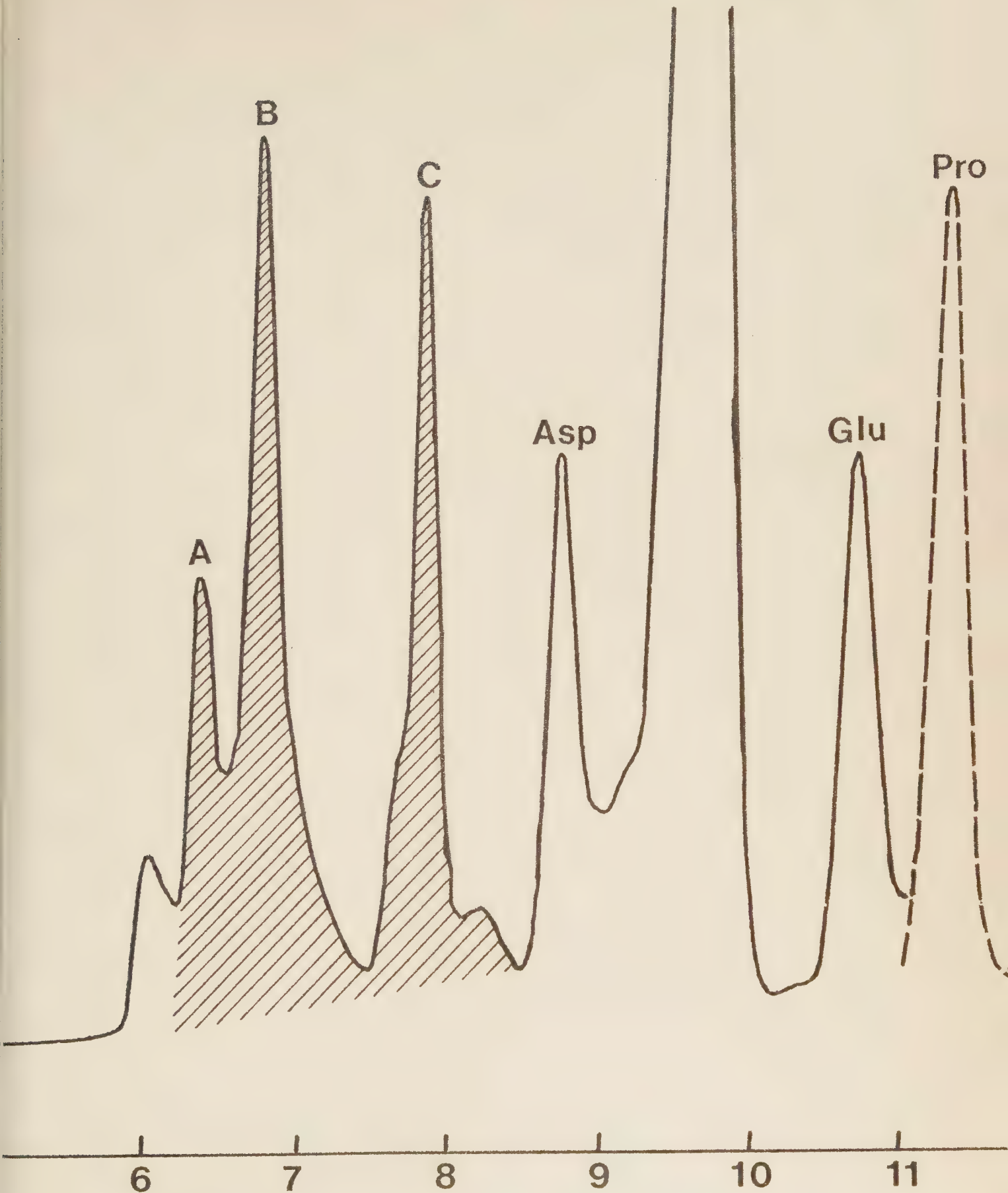


FIGURE 40 Pics des aminocétoses sur le diagramme de l'auto-analyseur des acides aminés

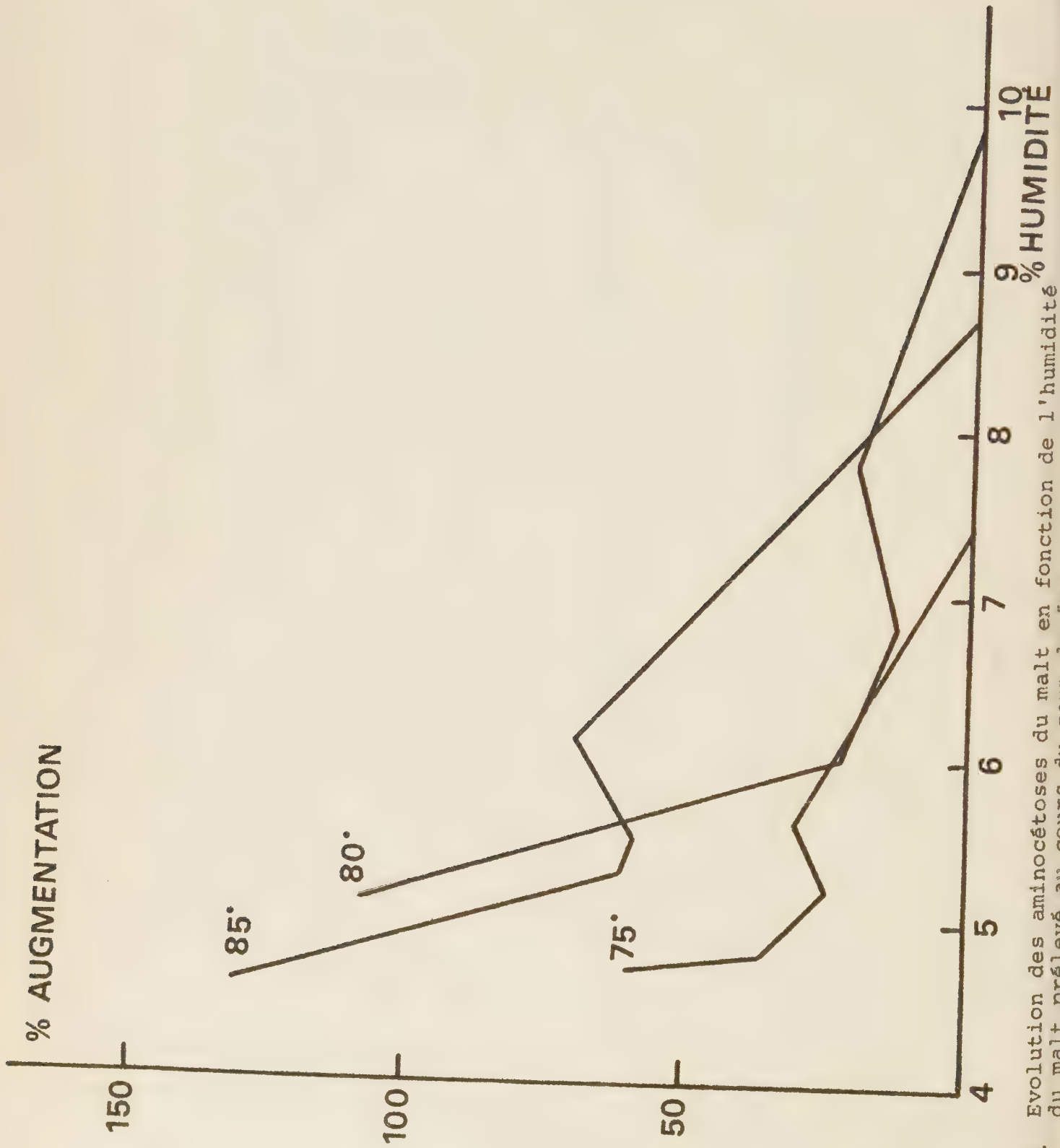


FIGURE 41 Evolution des aminocétoses du malt en fonction de l'humidité du malt prélevé au cours du cours de fermentation

Ce tableau nous indique très clairement l'influence de la température de coup de feu sur la formation des cétose-amines. Nous observons également une forte augmentation des cétose-amines lorsque l'humidité du malt descend en dessous de la zone critique de 6 % (Fig. 41).

Nous donnerons plus loin les détails d'une étude que nous avons réalisée sur l'isolement et l'identification de ces substances extraites à partir du malt.

1.3. CONCLUSIONS

Le problème des réactions de brunissement au touraillage est d'une grande complexité, en raison du nombre des constituants chimiques du malt vert en présence et de l'interférence des paramètres physiques comme le temps, la température, l'humidité du malt et l'hygrométrie de l'air chaud de touraille.

Les nouvelles recherches entreprises dans nos laboratoires sur le coup de feu, confirment d'abord des résultats antérieurs concernant le rôle de la zone critique de la température entre 80 et 85°C sur la formation de la couleur et de la surcoloration du malt; elles montrent de façon précise la participation des acides aminés et particulièrement des basiques dans les réactions de brunissement au coup de feu.

Elles mettent ensuite bien en évidence le rôle préparatoire du touraillage et du coup de feu à la formation de la couleur du moût bouilli (test KOLBACH-ZASTROW) qui préfigure sensiblement la couleur du moût à la fin de l'ébullition et par suite d'un intérêt technico-commercial.

Le rôle original de la zone critique de la courbe de sorption du malt, vers 6 % d'humidité est bien mise en évidence, tant dans la formation de la couleur, de la surcoloration que dans celle des substances réductrices, des cétose-amines du malt. Cela nous apparaît comme très important pour le malteur et nécessitera des recherches complémentaires au niveau du génie industriel (ventilation, vitesse de séchage). L'existence d'une hydrolyse enzymatique de l'amidon par l'*alpha*-amylase est très probable au coup de feu.

La mesure de l'activité des oxydases du malt (catalase, polyphénoloxydase) ne peut être vraiment une mesure absolue de contrôle de l'intensité de touraillage, comme certains ont pu le croire, un moment.

Enfin, dans la ligne de ce même travail, nous montrerons dans le chapitre suivant, le rôle de la température du malt à la descente de la touraille et de la durée de l'ensilage sur la couleur du moût et la qualité du malt.

2. PROBLEMES SOULEVÉS EN MALTERIE PAR LES CONDITIONS D'ENSILAGE DU MALT FRAIS

2.1. INTRODUCTION

Dans la pratique habituelle du maltage, on refroidit le malt à la fin du touraillage, afin d'empêcher notamment la formation ultérieure de coloration due aux réactions de Maillard. Cette opération a également pour but de préserver l'activité enzymatique du malt.

Cependant, on ne trouve aucune donnée précise dans la littérature brassicole concernant l'influence réelle de la température et du temps d'ensilage sur la qualité du malt.

Il est bien évident que les réactions de brunissement qui sont déjà sérieusement amorcées au coup de feu, peuvent continuer leur déroulement au cours de la conservation du malt, d'une manière plus ou moins intense en fonction de la température et de la durée de ce stockage.

L'influence de la température sur la vitesse des réactions de brunissement est bien connue dans la chimie de l'industrie alimentaire. Ainsi, les répercussions de ces réactions sur le produit dépendent de l'intensité de chauffage appliquée au cours des opérations unitaires. Par exemple, dans l'industrie brassicole, le rôle déterminant de la température du coup de feu sur la couleur et la surcoloration du malt a été démontré par plusieurs auteurs.

On sait par ailleurs, que l'intensité et la durée de chauffage sont deux facteurs essentiels et interchangeable des réactions de Maillard. En d'autres termes, on peut obtenir le même effet avec

un chauffage très faible appliqué pendant une longue période, ou avec un traitement intense sur une courte période.

A la demande de la Chambre Syndicale de la Malterie Française, nous avons procédé à deux séries d'expérimentations sur l'ensilage du malt et l'influence de la température.

2.2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Environ 5 kg d'échantillon de malt pâle prélevé à la fin du touraillage industriel ^(*) ont été divisés en deux portions. La première, après dégermage et refroidissement à la température ambiante, a été mise dans des récipients étanches, alors que l'autre portion a été directement mise dans une étuve thermostatée à la température de l'essai de l'ensilage. Cette portion de malt n'a pas été dégermée jusqu'au moment d'analyse, afin de ne pas permettre son refroidissement.

Nous avons réalisé deux essais d'ensilage : l'un à 40°C, durant 4 mois, l'autre à 60°C durant 3 mois. Sur des parties aliquotes de malt prélevées au cours de l'ensilage, les analyses suivantes ont été périodiquement exécutées : *couleur, surcoloration, pouvoir réducteur, taux de réductones, azote alpha-aminé, activité polyphenoloxidasique.*

D'autre part, au début et à la fin de chaque essai, les malts ont été soumis à une analyse conventionnelle complète, c'est-à-dire : *humidité, protéines totales, protéines solubles, pouvoir diastasique,*

(*) Ce malt nous a été aimablement fourni par la Malterie Laurent, que nous remercions très vivement.

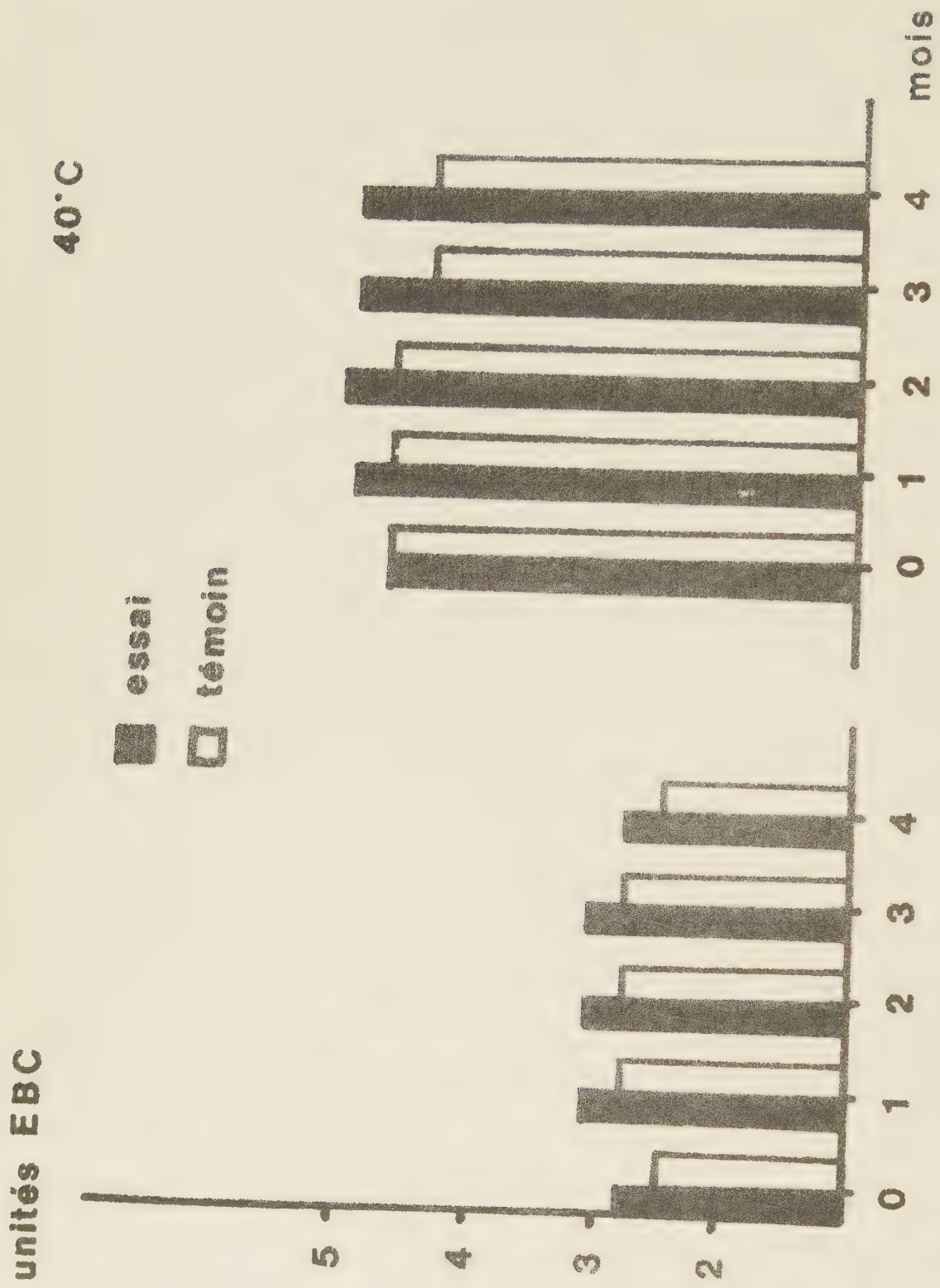


FIGURE 42

COULEUR

SURCOLORATION KZ

Evolution de la couleur et de la surcoloration du malt au cours de l'ensilage à 40°C

alpha-amylase, rendement en extrait, différence de rendement entre fine et grosse mouture, pH et viscosité du moût conventionnel, analyse Hartong.

Les méthodes utilisées pour la détermination du pouvoir réducteur, du taux de réductones et de l'activité polyphénoloxydasi- que ont été décrites dans le chapitre précédent.

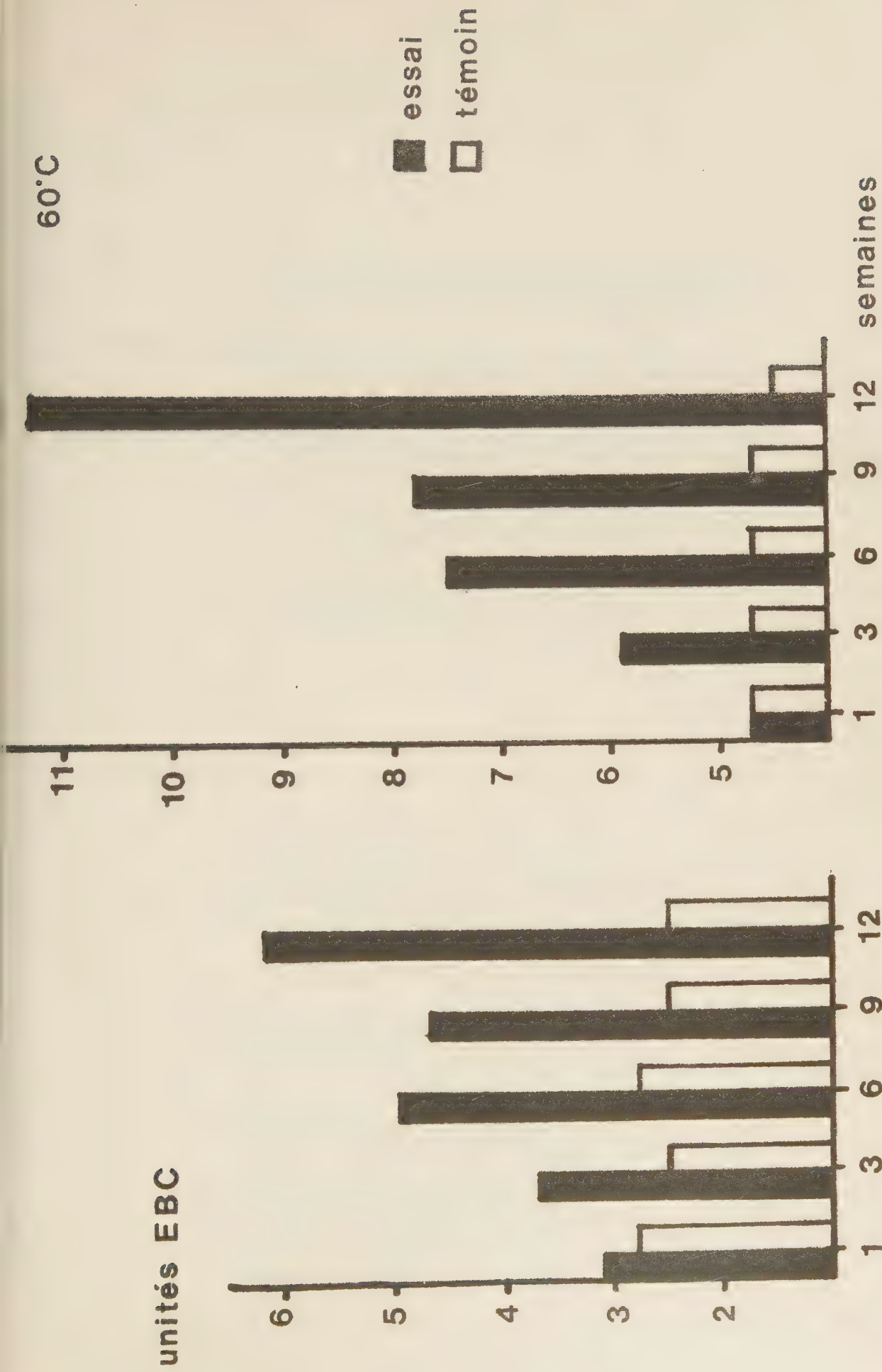
2.3. RESULTATS ET DISCUSSION

En premier lieu, nous avons étudié l'influence de la température et du temps d'ensilage sur la couleur et la surcoloration du malt. Les résultats présentés dans la figure (42) nous révèlent que ces deux critères analytiques du malt conservé à 40°C n'évoluent pas notablement pendant une période de 4 mois. Par contre, à 60°C (Fig.43) l'évolution est considérable , nous constatons une augmentation progressive de la couleur et de la surcoloration du malt tout au long de l'ensilage.

Ces résultats sont très intéressants dans la pratique.

Bien que nous n'ayons pas observé une augmentation excessive de la couleur et de la surcoloration dans nos conditions expérimentales au cours du stockage à 40°C, il n'est pas à suggérer d'ensiler le malt à cette température, car à l'examen de la figure (42), on remarque en effet que la couleur, et notamment la surcoloration du malt d'essai, sont légèrement supérieures à celles du malt témoin.

La formation des substances réductrices étant une des répercussions importantes des réactions de Maillard en brasserie, nous avons étudié leur évolution au cours de nos essais d'ensilage.

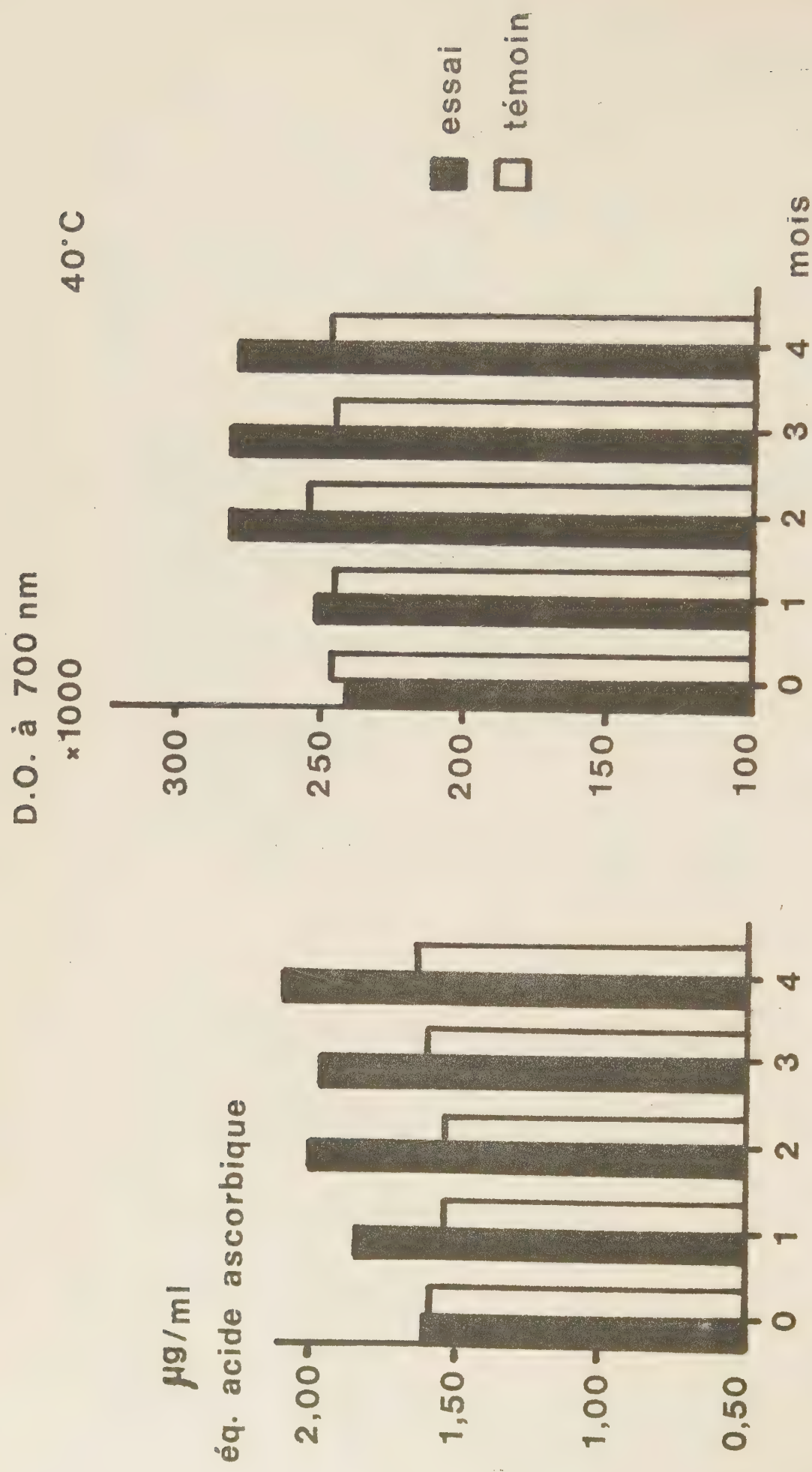


COULEUR

SURCOLORATION KZ

FIGURE 43 Evolution de la couleur et de la surcoloration du malt au cours de l'ensilage à 60°C





REDUCTONES

FIGURE 44 Evolution du taux des réductones et du pouvoir réducteur du malt (dosés sur le moût conventionnel) au cours de l'ensilage à 40°C

Les histogrammes de la figure (44) montrent, d'une manière évidente, que les réactions de Maillard ont bien eu lieu pendant l'ensilage du malt à 40°C, le pouvoir réducteur et le taux de réductones augmentent progressivement. Ainsi, les valeurs atteintes en fin d'ensilage sont supérieures aux valeurs initiales de l'ordre de 16 % pour le pouvoir réducteur et de 31 % pour le taux de réductones.

L'évolution de ces deux critères analytiques est naturellement bien plus considérable à 60°C (Fig. 45). On note une augmentation du pouvoir réducteur de l'ordre de 43 % et du taux de réductones de 80 % environ, au bout de 3 mois d'ensilage à 60°C.

Nous avons également suivi l'évolution de la teneur en azote-*alpha*-aminé du malt dosé sur le moût conventionnel, d'une part dans son rapport avec les réactions de Maillard, d'autre part, pour son intérêt pratique sur le plan technologique.

Les variations observées au cours de l'ensilage à 40°C ne sont pas significatives. Par contre, on enregistre une baisse progressive de l'ordre de 14 % pendant l'ensilage à 60°C (Fig. 46).

Il nous a paru intéressant ensuite d'étudier l'évolution de l'activité polyphénoloxidasique du malt pendant l'ensilage. On sait à l'heure actuelle que cette enzyme peut jouer un rôle sur la formation de la couleur du malt. D'autre part, étant donné sa thermosensibilité, la baisse de son activité pourrait être, comme nous l'avons dit, un indice relatif à l'intensité de touraillage.

La figure (47) montre une légère diminution de l'activité polyphénoloxidasique de l'ordre de 17 % au cours de l'ensilage du malt à 40°C, alors qu'à 60°C, au bout de trois mois, la baisse d'activité atteint à une valeur de 35 % environ (Fig. 48).

FIGURE 45

Evolution du taux des réductones et du pouvoir réducteur du malt (dosés sur le moût conventionnel) au cours de l'ensilage à 60°C

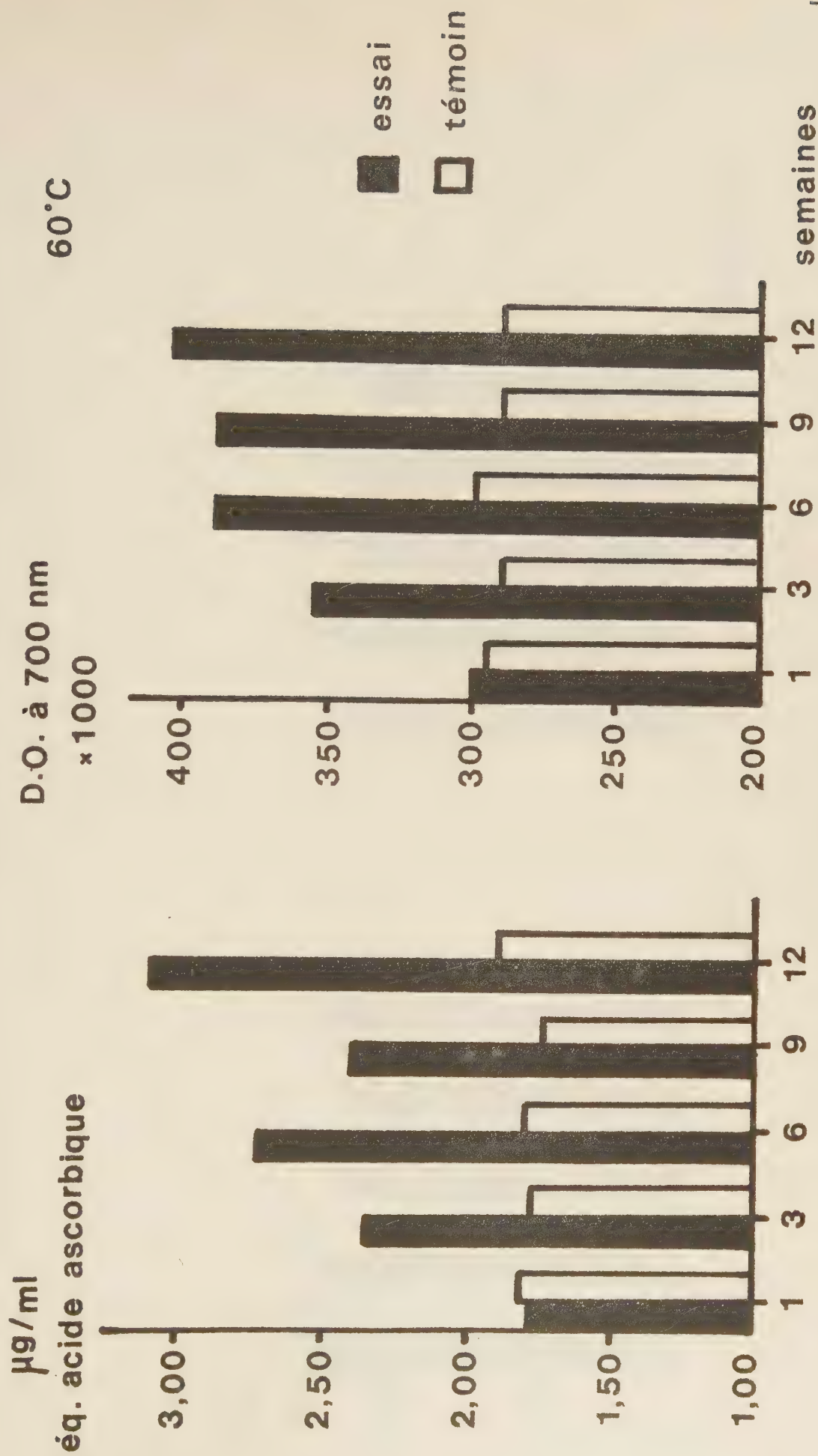
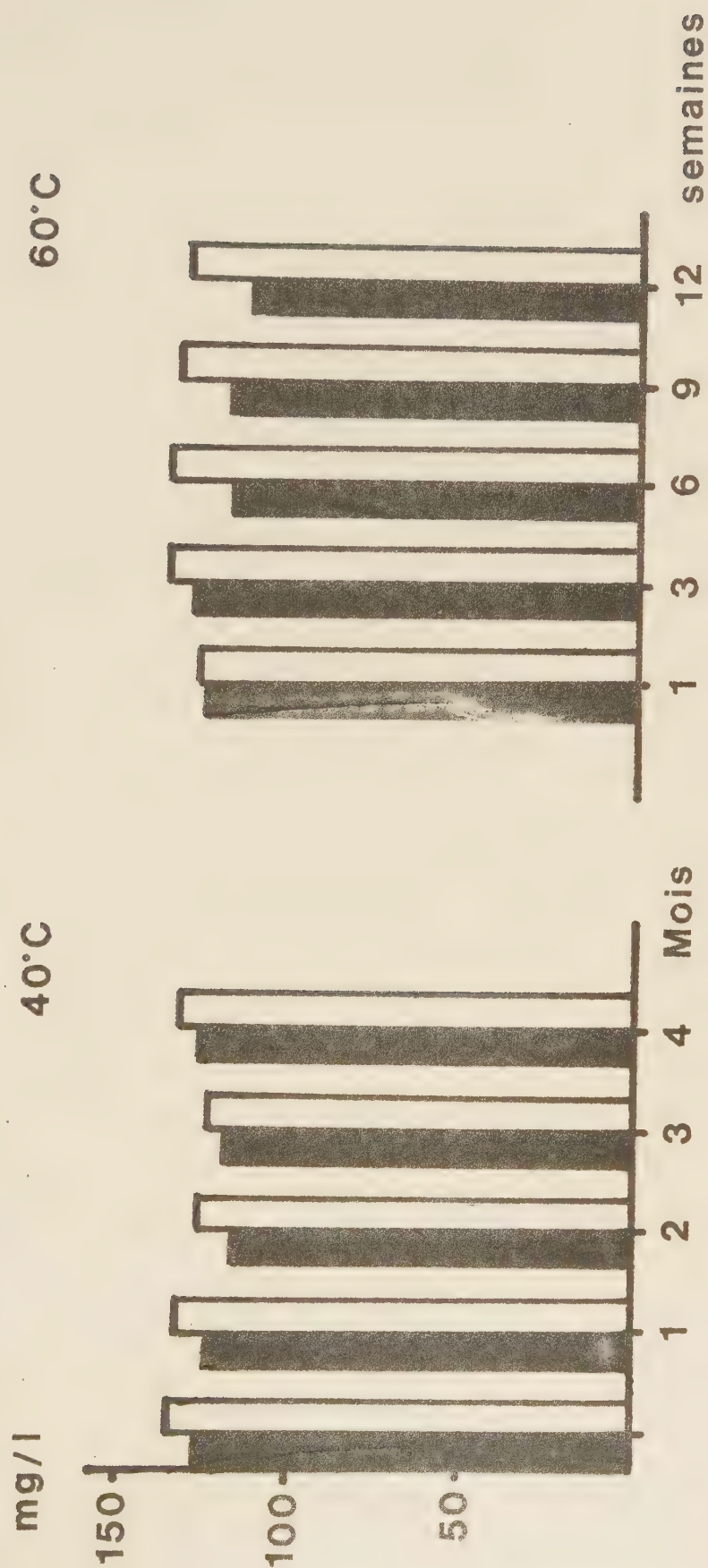


FIGURE 46

Evolution de la teneur en azote alpha-aminé du malt (dosée sur le moût conventionnel au cours de l'ensilage à 40 et 60°C.



AZOTE ALPHA AMINE

TABLEAU VI

ENSILAGE DE MALT PALE à 40°C

DURANT 4 MOIS

	Analyse de départ		Analyse finale	
	Témoin 20°C	Essai	Témoin 20°C	Essai
Humidité	5,0	4,9	5,3	5,1
Protéïnes totales	11,8	12,2	11,8	12,0
Protéïnes solubles	3,9	3,9	3,9	3,6
Indice KOLBACH	33	32	33	30
Pouvoir diastasique	310	270	290	270
Alpha amylase	29,5	28,0	28,0	26,0
pH	5,91	5,92	5,91	5,86
Extrait % m.s.	78,9	78,6	78,6	78,4
Différence f.g. mouture	2,8	2,4	2,1	2,1
Viscosité	1,54	1,53	1,53	1,53
Indice HARTONG				
E.R. 20°	24,1	24,0	23,8	24,2
45°	32,1	33,3	31,3	31,0
65°	99,4	99,0	99,1	99,2
80°	95,0	94,6	94,7	94,9
Chiffre de dissolution	4,5	4,6	4,2	4,2

Afin de mieux connaître l'influence de la température d'ensilage du malt, nous avons effectué un certain nombre de déterminations conventionnelles sur les lots de malts, au début et à la fin de nos essais.

Le Tableau VI rassemble les résultats obtenus sur le malt conservé à 40°C.

D'une manière générale, on n'observe pas de variations importantes des critères relatifs à la qualité du malt.

Le malt conservé à 40°C absorbe un peu moins d'eau par rapport au malt témoin pendant la période d'ensilage, ce qui est tout-à-fait normal.

On note une légère diminution de la teneur en protéines solubles due probablement d'une part aux réactions de brunissement et d'autre part, à une inhibition de l'activité protéolytique du malt pendant la conservation. Cependant, cela ne se confirme pas d'après les résultats d'analyse de la teneur en azote *alpha*-aminé.

Il n'y a pas de différences significatives pour le rendement en extrait, la différence de rendement entre fine et grosse mouture, le pouvoir diastasique, l'activité *alpha*-amylase, l'analyse Hartong du malt, la viscosité, le pH du moût conventionnel au début et à la fin de l'ensilage.

Les résultats d'analyses conventionnelles du malt conservé à 60°C et ceux du malt témoin, présentés dans le Tableau VII nous révèlent par contre des changements assez importants de la qualité du malt intervenus au cours de l'ensilage.

Le séchage du malt se poursuit lentement, on note une baisse de l'humidité de l'ordre de 0,7 %. Des baisses importantes ont été également enregistrées en ce qui concerne la teneur en protéines solubles,

TABLEAU VII

ENSILAGE DU MALT PALE à 60°C

DURANT 3 MOIS

	Analyse de départ		Analyse finale	
	Témoin 20°C	Essai	Témoin 20°C	Essai
Humidité	4,8	3,5	4,8	2,8
Protéïnes totales	11,5	11,6	11,4	11,3
Protéïnes solubles	3,9	4,0	3,8	3,6
Indice KOLBACH	34	35	34	32
Pouvoir diastasique	230	240	280	130
pH	5,77	5,77	5,77	5,56
Extrait % m.s.	80,6	79,8	80,2	78,2
Différence f.g. mouture	3,0	2,9	2,8	2,9
Viscosité	1,63	1,57	1,61	1,69
Indice HARTONG				
E.R. 20°	23,8	23,4	24,5	23,8
45°	32,6	32,3	34,0	32,2
65°	98,6	99,9	99,1	99,0
80°	91,7	91,9	90,2	88,7
Chiffre de dissolution	3,6	3,8	3,9	2,8

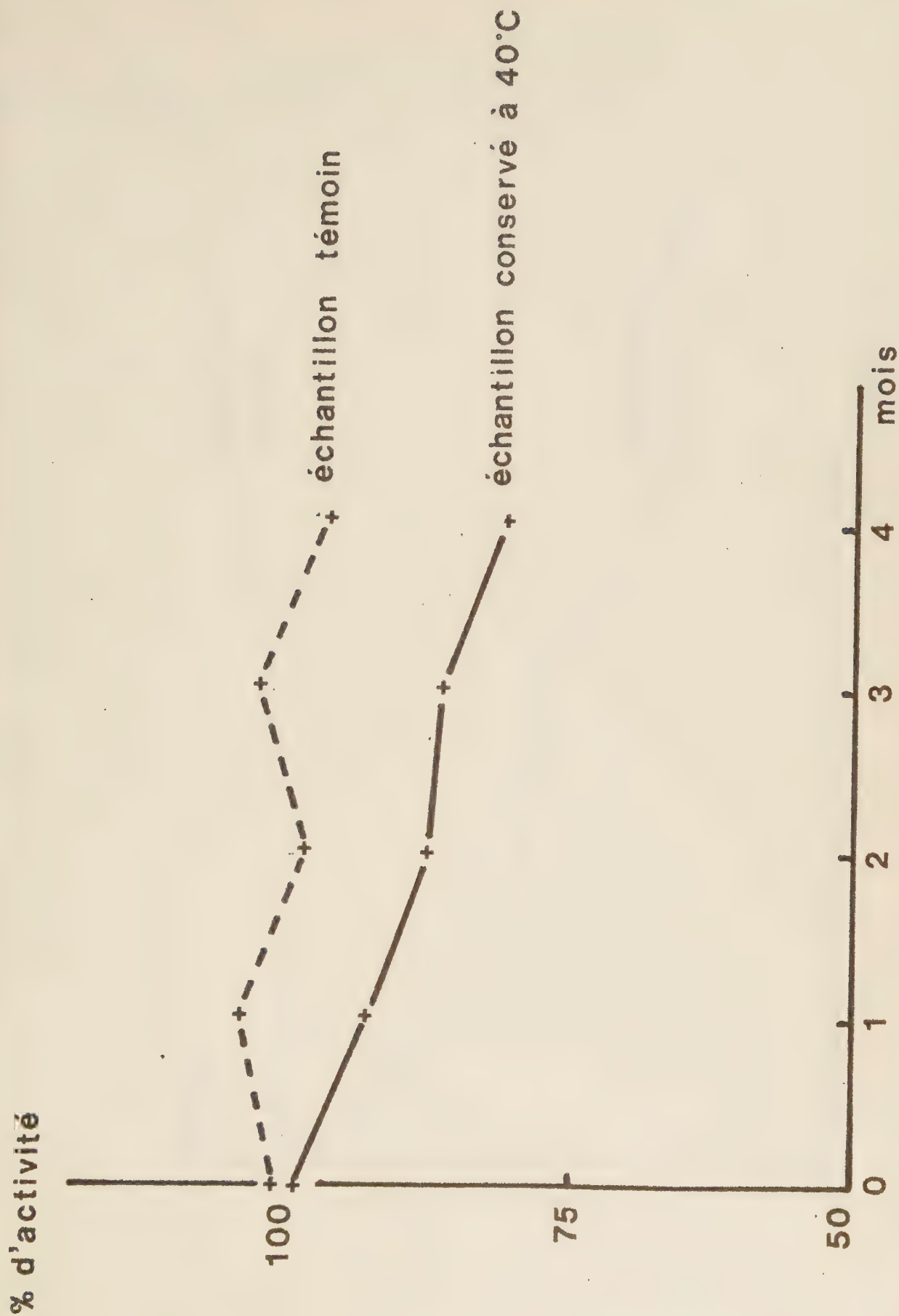


FIGURE 47 Evolution de l'activité polyphénoloxydase au cours de l'ensilage à 40°C

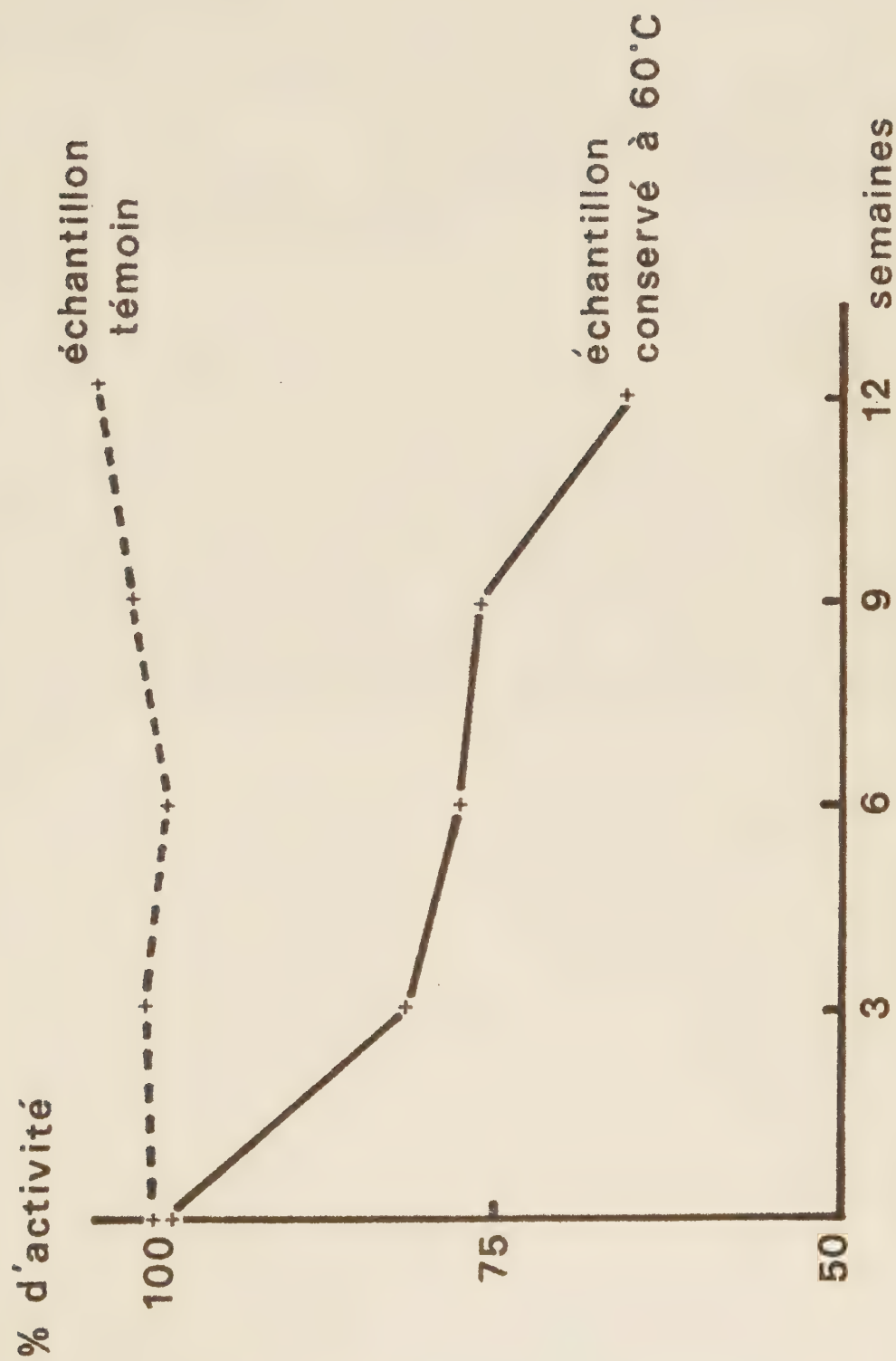


FIGURE 48 Evolution de l'activité polyphénoloxidasique du malt au cours de l'ensilage à 60°C

le pouvoir diastasique, le rendement en extrait et le pH du moût conventionnel pendant la conservation du malt à 60°C.

La différence de rendement entre fine et grosse mouture n'a pas été influencée par l'ensilage à 60°C.

La viscosité du moût conventionnel augmente légèrement.

Les différences constatées dans les résultats d'analyses Hartong ne sont pas significatives.

2.4. CONCLUSION

A la suite de ce travail expérimental, il apparaît ainsi raisonnable de stocker le malt à une température au plus égale à 35°C en silo, si l'on veut maintenir sa qualité avant le brassage.

SOMMER et SCHILFARTH (1975) dans leur article publié très récemment, confirment nos résultats expérimentaux à ce sujet.

3. ETUDE DES PHENOMENES DE SORPTION DANS LE MALT EN RELATION AVEC LA VARIETE D'ORGE ET SON NIVEAU DE DESAGREGATION

3.1. INTRODUCTION

Les transformations enzymatiques, biochimiques et physiques qui se produisent dans des milieux biologiques peu hydratés sont fortement liées à l'état de l'eau présente dans ces milieux.

Aussi avons-nous montré, dans le chapitre premier de cet exposé, l'importance du degré d'humidité du malt, d'une part sur l'évolution des critères analytiques du malt relatifs aux réactions de Maillard, d'autre part, sur la dégradation probablement enzymatique de l'amidon pendant le coup de feu.

La méthode de "sorption" est un des moyens d'investigation qui fournit des renseignements précis sur l'état de l'eau dans des milieux peu hydratés. De tels renseignements sont indispensables pour la compréhension des réactions biochimiques qui se déroulent pendant le processus de l'industrie alimentaire ou au cours du stockage des produits. Ils permettent en outre, de résoudre un certain nombre de problèmes de séchage en génie industriel.

Dans le domaine de la malterie, les travaux contribuant à la connaissance de l'état de l'eau dans le malt ont été très peu nombreux. On trouve quelques renseignements élémentaires dans les articles de JOHNSTON (1954) et de SFAT (1965).

Pourtant, des recherches plus poussées sur le malt de ce point de vue, pourraient apporter des informations extrêmement utiles au malteur pour la conduite plus efficace de son travail journalier.

Dans le cadre du présent travail, nous allons étudier l'influence de la variété de l'orge et du niveau de désagrégation du malt sur l'évolution de l'état de l'eau au cours de la deshydratation, après avoir fait un court rappel sur les notions fondamentales.

3.2. NOTIONS FONDAMENTALES SUR L'ETAT DE L'EAU DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES ET L'IMPORTANCE DES PHENOMENES DE SORPTION

La plupart des milieux biologiques naturels offrent, en fonction de la quantité d'eau qu'ils renferment, une texture présentant à des degrés divers, une certaine rigidité, en même temps que plusieurs propriétés de l'état liquide.

La rigidité qui implique l'existence des forces d'attractions importantes entre les constituants d'un milieu, est une des caractéristiques principales de l'état solide.

Dans ces conditions l'eau intervient à la fois :

- comme élément participant à l'organisation des constituants du système,
- comme solvant permettant le déplacement des molécules et facilitant ainsi les réactions enzymatiques et chimiques.

Au fur et à mesure que la concentration en eau diminue, celle-ci va jouer un rôle prépondérant comme agent d'organisation et devenir un facteur limitant des réactions.

En raison de la dissymétrie de ses charges positive et négative, la molécule d'eau se comporte comme un dipôle. L'existence d'un moment électrique dipolaire élevé provoque l'association des molécules d'eau entre elles et leur organisation dans le cristal de glace. Elle

explique également leur tendance à s'unir soit avec les ions pour former des ions hydratés, soit avec d'autres molécules polaires.

Au contact de groupements polaires, le dipôle H_2O serait fixé par des forces électriques de même nature que celles associant les molécules d'eau entre elles mais plus fortes.

De nombreuses molécules biologiques, acides aminés, protéines, oligoholosides, polyholosides notamment en raison de leurs groupements polaires, possèdent une affinité importante pour l'eau ; ce sont des molécules hydrophiles.

Les principaux groupements responsables de cette affinité pour les molécules d'eau sont les suivantes : le groupe carboxyle, le groupe aminé, le groupe hydroxyle, le groupe aldéhyde, le groupe carbonyle.

C'est donc en fonction de ces groupements que se feront au cours des phénomènes d'hydratation, la localisation et l'orientation des molécules d'eau à la surface des macromolécules.

Dans les composés ainsi hydratés, les molécules d'eau sont retenues avec une énergie d'autant plus grande que la distance du dipôle H_2O au groupement polaire est plus faible. On conçoit donc qu'il puisse exister tous les intermédiaires entre l'eau la plus solidement fixée et l'eau dite "libre" ; autrement dit, il y aurait une variation d'activité thermodynamique de l'eau allant de celle de l'eau pure à celle d'une activité si réduite que la molécule d'eau retenue ferait partie quasi intégrante de la particule qui la retient.

Ainsi, l'eau contenue dans un produit va exercer une pression de vapeur (p') inférieure ou égale à celle de l'eau pure (p), en fonction de son état de liaison avec les constituants du produit à une température " t " donnée.

2000 0.5



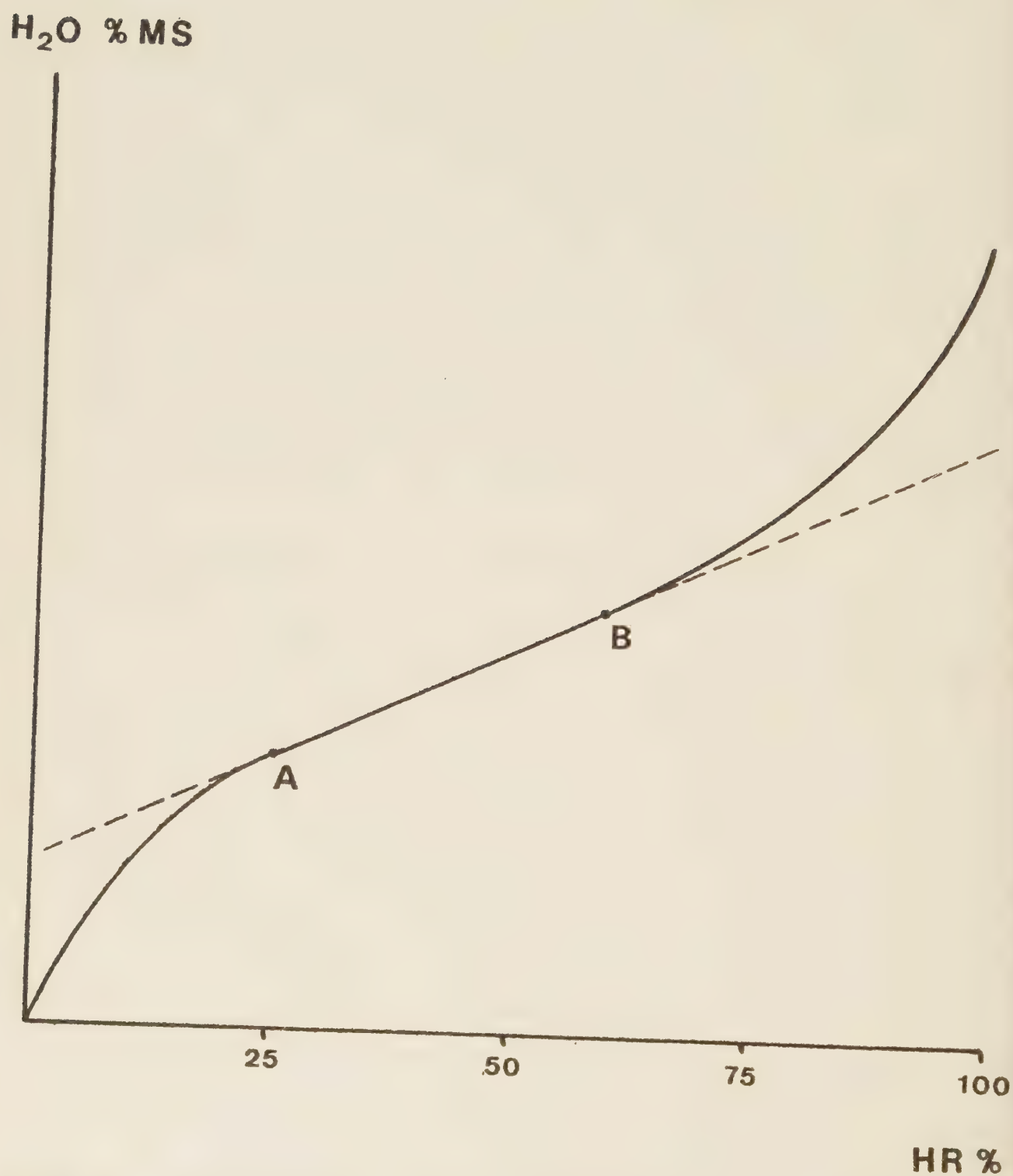


FIGURE 49 Représentation schématique d'une courbe de sorption

Le rapport $\frac{p'}{p}$ nous donne donc la pression relative de vapeur d'eau en équilibre avec le système eau-substrat à la température "t".

Ce rapport communément appelé "*l'humidité relative d'équilibre*" représente d'une manière approchée l'activité de l'eau dans le système.

Si le produit est mis en contact avec un gaz, par exemple avec de l'air, un état d'équilibre est atteint lorsque la pression de vapeur d'eau dans l'air est égale à la pression de vapeur d'eau dans le produit.

Dans cet état d'équilibre, le degré hygrométrique de cet air qui est par définition le rapport entre la pression de vapeur d'eau dans l'air et la pression de vapeur d'eau saturante sera égal à l'humidité relative d'équilibre du produit.

En portant sur un graphique la quantité d'eau fixée par un produit en fonction de l'humidité relative d'équilibre (ou l'activité de l'eau) on obtient une courbe de sorption en forme de sigmoïde (Fig. 49).

Suivant que les mesures seront effectuées au cours de la deshydratation du milieu (désorption) ou en cours de la réhydratation du produit sec (adsorption), on obtiendra généralement deux courbes non nécessairement superposables, c'est ce que l'on appelle le phénomène d'hystérésis.

En faisant varier la température, on obtiendra un réseau d'isothermes de sorption, l'affinité pour l'eau des produits diminuant au fur et à mesure que la température s'élève.

La courbe de sorption est généralement interprétée comme décrivant plusieurs phénomènes qui se succèdent en superposant plus ou moins. On distingue généralement 3 régions :

- une région OA, correspondant à une adsorption d'eau par liaison hydrogène sur des sites fortement polaires ,

- une seconde région AB linéaire, pouvant être confondue avec la tangente au point d'inflexion des courbes, pour laquelle les molécules d'eau forment une ou plusieurs couches additionnelles plus faiblement retenues. Dans cette région, on peut considérer que lorsque l'activité de l'eau croît, la substance dissout de l'eau pour former une solution solide, en suivant la loi de proportionnalité de HENRY.

- enfin, une troisième région apparaît lorsque la courbe de sorption s'écarte de la partie linéaire (point B) ; une nouvelle phase(aqueuse) apparaît et une quantité d'eau de plus en plus importante se fixe par des forces plus faibles, de nature capillaires ou osmotique.

Les indications qu'on peut obtenir à partir de la courbe de sorption d'un produit pourraient trouver une application directe dans la pratique, pour la mise au point de processus technologiques alimentaires et de conditions de stockage du produit.

Car d'une manière générale, toutes les réactions chimiques et biochimiques nécessitent un minimum d'humidité relative pour leur démarrage.

Ce seuil d'humidité ne correspond pas obligatoirement à la même teneur en eau pour chaque produit. Car, comme on le sait, cela dépend de l'interaction de l'eau avec les constituants du milieu, donc, la composition chimique du produit est un facteur déterminant.

De nombreux travaux ont été effectués en vue de définir le minimum d'humidité relative nécessaire pour ces diverses manifestations qui ont lieu dans les milieux biologiques.

Par exemple, dans le cas des réactions de Maillard, ce minimum est de l'ordre de 30 % (0,30 d'activité) ; à partir de ce point les réactions s'accélèrent en fonction de l'humidité relative du milieu jusqu'à une valeur de 70 % (0,70 d'activité), puis leur vitesse diminue à cause de l'action inhibitrice de l'eau.

Les activités des microorganismes sont aussi conditionnées par l'humidité relative. La multiplication des bactéries exige un minimum d'humidité relative de 95-97 %, ce seuil est voisin de 90 % pour les levures, alors que pour la prolifération de certains types de moisissures il n'est que 70 à 80 % et même inférieur.

La majeure partie des produits alimentaires contient des systèmes enzymatiques actifs, si bien qu'en plus des modifications d'ordre chimique et microbiologique, on observe souvent au cours de leur fabrication ou de leur stockage :

- d'une part des manifestations du métabolisme cellulaire telle que la respiration ou les fermentations intra-cellulaires,
- d'autre part, des processus enzymatiques intervenant après dislocation des cellules : hydrolyses, fermentations, activités des enzymes qui interviennent dans la respiration.

L'humidité constitue un facteur primordial pour ces phénomènes essentiels influençant la qualité des produits alimentaires.

Cependant, on ne trouve que très peu de renseignements dans la littérature permettant de connaître, pour une enzyme déterminée le seuil de l'HR à partir duquel elle réagit et la cinétique de son action en fonction d'hydratation.

Les travaux de DRAPRON et GUILBOT (1962 b) sur la dégradation de l'amidon par les amylases en milieux peu hydratés ont apporté des précisions très intéressantes à ce sujet.

Ces auteurs présument que l'on peut fixer le seuil de démarrage de l'action amylolytique d'après l'allure de la courbe de sorption du milieu, à partir de l'existence d'une quantité minimale d'"eau solvante". L'augmentation de la température et de l'hydratation, facteurs susceptibles de fournir plus de mobilité au milieu, accroîtrait la vitesse de l'amylolyse et sa valeur limite.

Lorsqu'il s'agit de séchage d'un produit, la connaissance de la courbe de sorption de ce dernier peut permettre au technicien une meilleure mise au point de cette opération.

Pour mieux comprendre l'intérêt de cette connaissance, rappelons brièvement les principes fondamentaux du séchage en nous référant à l'excellent ouvrage de LONCIN (1961).

Le séchage a pour but d'éliminer par vaporisation un corps liquide volatil contenu dans un corps non volatil .

Un liquide ne se vaporise que si sa pression de vapeur est supérieure à la pression à laquelle se trouvent ses vapeurs dans la phase gazeuse en contact avec la matière. Il s'ensuit donc que la vitesse de séchage d'un produit va dépendre de l'écart entre ces deux pressions ; si cet écart est grand, l'allure de séchage sera accélérée.

Dans la pratique, il s'agit le plus souvent d'évaporer l'eau dans des produits solides et pour résoudre les problèmes de la vitesse du séchage, on utilise généralement l'expression "Humidité Relative" au lieu de pression de vapeur d'eau. Cette expression introduit en effet une simplification due au fait qu'elle varie beaucoup moins avec la température que la valeur isolée de pression de vapeur d'eau.

Dans ces conditions, l'allure de séchage d'un produit va être déterminée par la différence entre l'HR du produit et de celle de l'air séchant.

Lorsqu'un corps solide contenant de l'eau est soumis à des conditions de séchage identiques dans le temps (passage d'un courant d'air de caractéristique donnée, chauffage à température constante à travers une parois, etc...) la teneur en eau évolue de façon à nous permettre de distinguer trois périodes successives :

La première période correspond à la mise à température de matière. Pendant la deuxième période, il y a une diminution linéaire de la teneur en eau, c'est-à-dire que l'allure de séchage reste constante. La pression de vapeur d'eau ne varie pas avec la concentration, l'humidité relative du produit est donc égale à 100 % (1,0 d'activité).

A partir du moment où cette valeur ne peut plus être considérée comme égale à 100 %, c'est-à-dire que la teneur en eau est inférieure à l'humidité critique, le séchage entre dans la phase ralentie, l'allure tendant vers zéro au fur et à mesure que le HR tend vers le degré hygrométrique de l'air. Pendant cette période, la vitesse de séchage est fonction de l'état de liaison de l'eau avec les constituants du produit. Par conséquent, la courbe de sorption de ce produit nous permet de prévoir cette vitesse dans des conditions de séchage déterminées.

3.3. TECHNIQUES EXPERIMENTALES

3.3.1. Méthode de Micromaltage

La méthode à laquelle nous avons fait appel est celle adoptée comme méthode standart dans notre laboratoire.

Le trempage de l'orge se fait dans des paniers métalliques suspendus, pouvant être immergés ou retirés de l'eau selon un programme automatique à 15°C. La durée de l'opération est de 55 heures pendant laquelle l'orge reste en total 33 heures sous eau et 22 heures à l'air. On atteint un taux d'humidité de 44-45 % environ dans l'orge à la fin du trempage.

Pour la germination, on place les paniers dans des pots en terre cuite, humidifiés, type KAVERT, et on laisse germer à la même température en retournant l'orge deux fois par jour.

Dans le cadre de ce travail, en vue d'obtenir des malts différemment désagregés, nous avons fait des prélèvements le troisième, quatrième et sixième jour de la germination.

Les malts verts ainsi obtenus ont été séchés dans une micro-touraille décrite au chapitre 1.1.2., à 50°C pendant 6 heures, jusqu'à un degré d'humidité de 10 % environ.

Après quoi, les malts ont été dégermés et le séchage a été poursuivi dans une étuve à vide à 35°C.

Les échantillons de malts prélevés périodiquement pendant cette opération ont été utilisés d'une part pour la détermination de la pression de vapeur d'eau, d'autre part, pour le dosage de l'humidité et pour l'analyse conventionnelle de désagregation selon les méthodes Analytica EBC 1975.

3.3.2. Détermination de la pression de vapeur d'eau du malt

A cet effet, nous avons utilisé la méthode décrite par JOHNSTON (1954), qui consiste à déterminer le point de rosée de l'air en équilibre avec le malt dans un appareillage schématisé dans la figure (50).



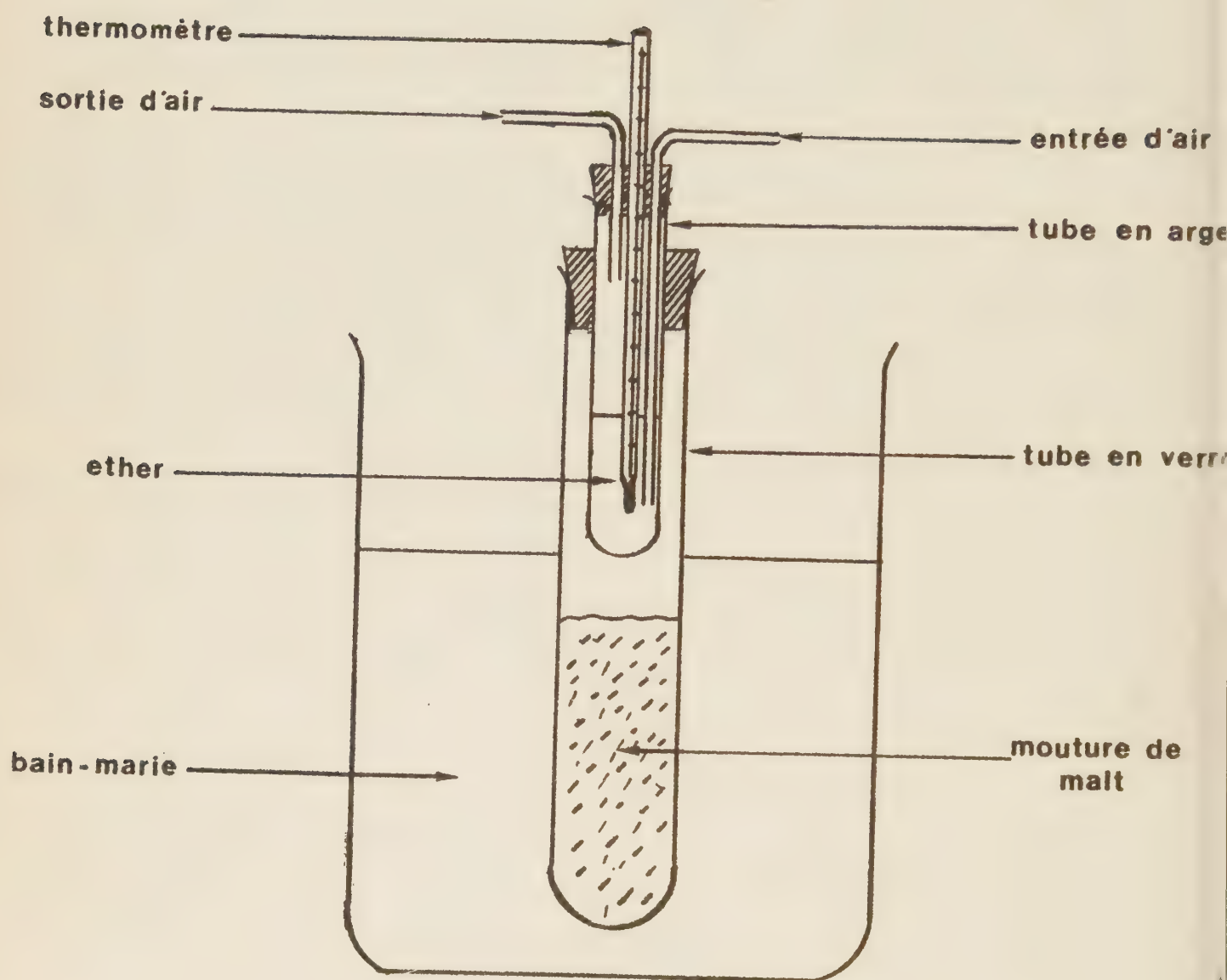


FIGURE 50 Schéma d'appareillage pour la détermination de la pression de vapeur d'eau du malt (D'après JOHNSTON, 1954)

On place 50 g de mouture grossière de malt dans le large tube en verre parfaitement sec. Cela a comme avantage d'accélérer l'établissement de l'équilibre dans le système sans influencer les mesures (BECKER et SALLANS, 1956 ; SOOD et HELDMAN, 1974) .

Après quoi, on adapte immédiatement le tube en argent poli au tube en verre à l'aide d'un bouchon en caoutchouc percé. Le tout est immergé dans un bain-marie de telle façon que le niveau de l'eau de ce dernier soit environ 2 cm supérieur au niveau de la mouture qui se trouve dans le tube en verre. Le bain-marie est réglé à une température bien définie.

Pour nos essais, nous avons utilisé une température de 25°C.

Quelques heures après, lorsque l'équilibre est atteint dans le système (cela peut être contrôlé en effectuant des mesures par intervalle de 30 minutes jusqu'à ce que l'on obtienne deux mesures dont l'écart est 0,5°C au maximum), on verse de l'éther dans le tube en argent et on l'évapore en barbotant de l'air à l'aide d'un petit compresseur.

La température d'éther où la rosée commence à se déposer sur la surface externe du tube en argent est prise comme point de rosée de l'air en équilibre avec le malt. Pour vérifier ce point, on laisse l'éther se réchauffer et on observe la température de la disparition de la rosée.

La pression de vapeur d'eau du malt pour une température déterminée est ensuite obtenue en se référant à des tables d'humidité.

La perte de vapeur d'eau en petite quantité qui peut intervenir lors de la mise en équilibre de l'air du tube avec le malt n'influence pas sensiblement la teneur en eau du malt. Cela a été vérifié en

dosant l'humidité du malt avant et après l'opération.

L'humidité relative (l'activité de l'eau) du malt à la température d'essai par la suite est calculée selon la formule :

$$HR = \frac{p' \text{ (pression de vapeur d'eau du malt)}}{p \text{ (pression de vapeur d'eau saturante)}}$$

Pour vérifier l'exactitude des mesures obtenues selon cette méthode, nous avons fait des déterminations à l'aide des solutions saturées de sels dont l'humidité relative est connue.

D'après les résultats présentés dans le tableau (VIII), on peut conclure que la méthode permet d'effectuer des mesures valables.

TABLEAU (VIII) Comparaison des valeurs HR trouvées par la méthode décrite, dans les solutions saturées de sels avec celles données dans la littérature.

Sels	HR à 20 - 23°C d'après la littérature	HR trouvé à 23°C selon la méthode décrite
NaCl	75 - 78 %	76,3 %
NH ₄ NO ₃	64 - 67 %	66,4 %
MgCl ₂ ·6H ₂ O	33 - 34 %	33,7 %

Nous avons ensuite étudié la répétabilité de la méthode. A partir des résultats obtenus par 10 déterminations effectuées sur un échantillon de malt, nous avons trouvé les valeurs suivantes :

Moyenne : 22,7

Etendue : 0,8

Ecart-type : 0,26

Coefficient de variation : 1,18 %

On obtient donc des résultats d'une bonne répétabilité.



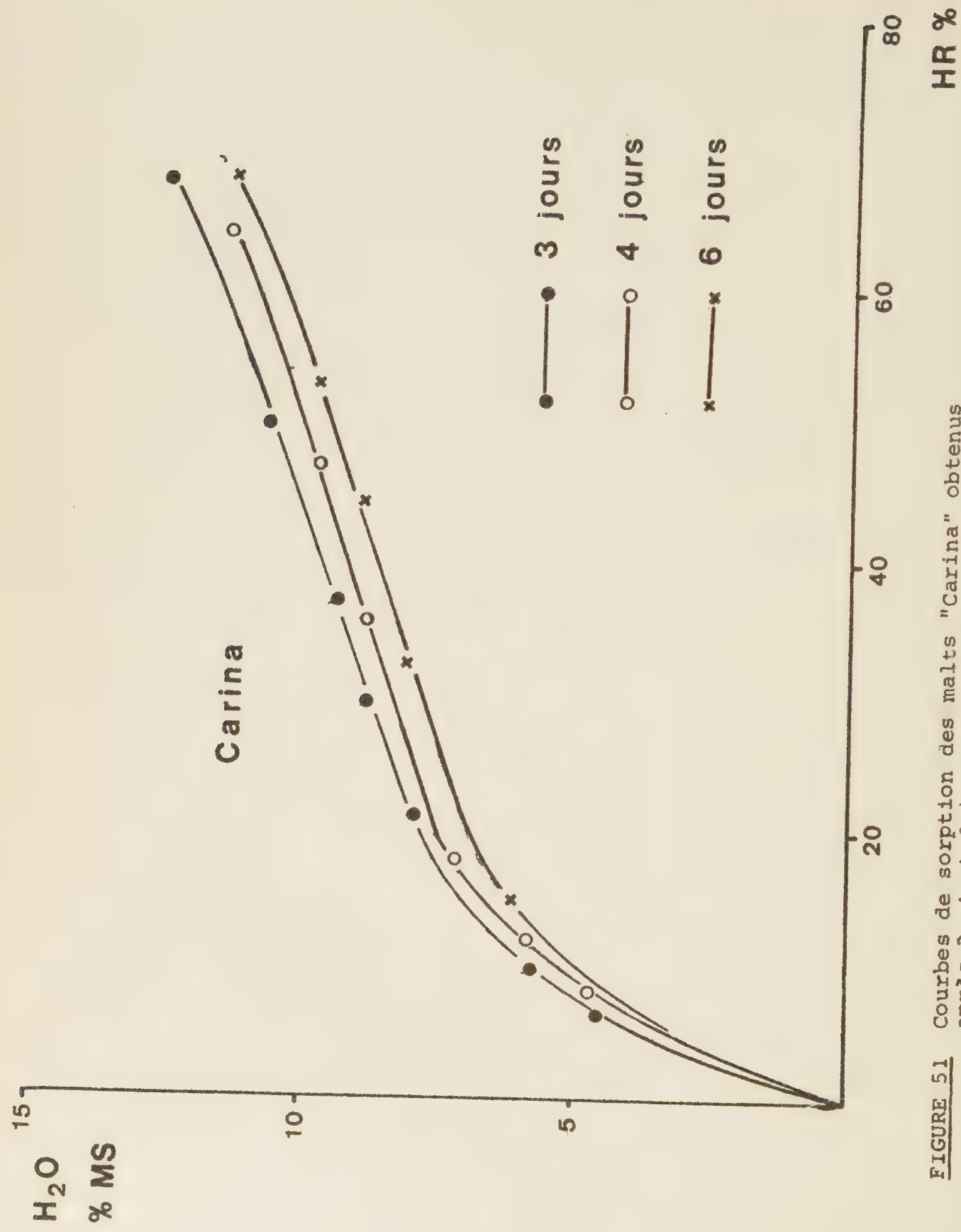


FIGURE 51 Courbes de sorption des malts "Carina" obtenus après 3, 4 et 6 jours de germination

3.4. RESULTATS ET DISCUSSION

La figure (51) illustre les courbes de sorption de trois malts d'une même variété d'orge (*Carina*) et obtenus dans les conditions de micromaltage identique à l'exception de la durée de germination qui a varié de 3 à 6 jours.

Ces courbes en forme de sigmoïde classique nous permettent de distinguer les trois phases principales de l'état de l'eau en fonction de l'humidité du malt. On observe ainsi, une zone où les molécules d'eau sont très fortement liées aux constituants hydrophiles du malt, une zone linéaire correspondant au passage de l'eau liée à l'eau libre et enfin une dernière zone indique l'apparition de l'eau libre dans le malt.

Le fait le plus curieux que l'on observe à l'examen de ces courbes c'est qu'elles ne se superposent pas pour ces trois malts différemment désagrégés bien qu'elles aient la même allure.

Elles se distinguent les unes des autres de façon telle que pour une teneur en eau donnée, l'activité de l'eau (l'humidité relative) dans le malt augmente avec la durée de germination de ce dernier.

Ces trois malts ont été ensuite soumis à une analyse conventionnelle en vue de vérifier leur niveau de désagrégation.

Les résultats présentés dans le tableau (IX) nous permettent en effet, de différencier ces malts ; leur niveau de désagrégation varie avec la durée de la germination.

TABLEAU (IX) Influence de la durée de germination
sur le niveau de désagrégation du
malt "Carina"

	:	:	:
	:	:	:
	3 jours	4 jours	6 jours
	:	:	:
Protéines solubles	3,7	3,9	3,9
	:	:	:
Indice Kolbach	37	39	38
	:	:	:
Différence fine-grosse mouture	1,6	1,4	0,6
	:	:	:
Viscosité	1,58	1,50	1,47
	:	:	:

A partir de ce point, on peut supposer donc qu'il existe une relation entre l'état de liaison de l'eau dans le malt et son niveau de désagrégation dans ce sens que plus le malt est désagrégé, plus sa pression de vapeur d'eau augmente.

La différence de l'activité de l'eau entre les malts extrêmes pour un degré d'humidité donné est en moyenne de 0,12 dans la zone linéaire des courbes ; ce qui correspond à un écart de degré d'humidité de 1 % ($\text{g H}_2\text{O} / 100\text{g MS}$) en moyenne entre ces malts ayant la même valeur d'activité de l'eau.

Nous avons par la suite établi les courbes de sorption des malts fabriqués dans les mêmes conditions à partir d'autres variétés d'orge afin de pouvoir tirer une conclusion générale sur ce phénomène.

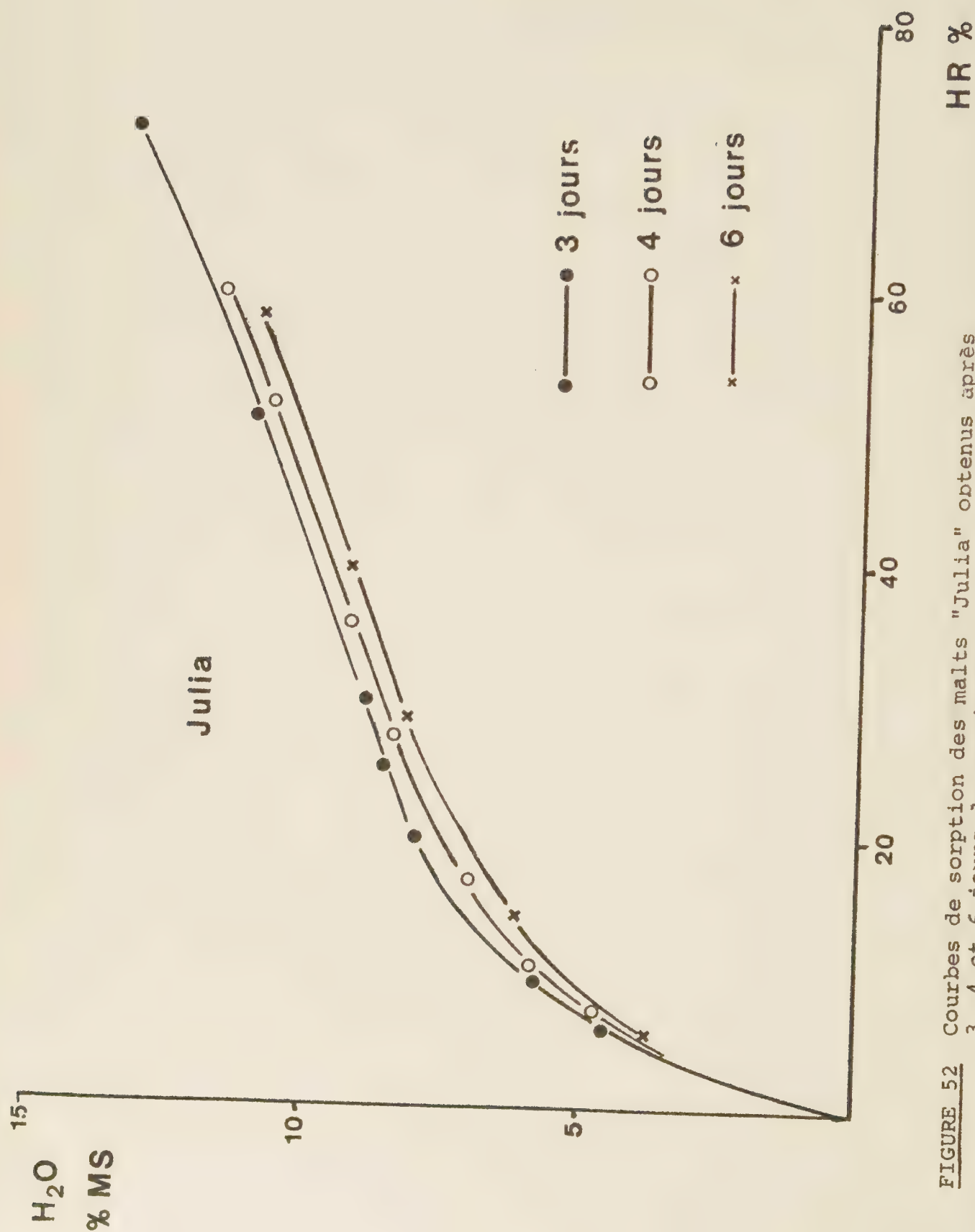


FIGURE 52 Courbes de sorption des malts "Julia" obtenus après 3, 4 et 6 jours de germination

Les courbes présentées dans les figures (52) et (53), des malts provenant de l'orge *Julia* et *Bérac* nous confirment en effet, l'existence de la relation entre l'état de l'eau dans le malt et son niveau de désagrégation (voir tableau X)

TABLEAU (X) Influence de la durée de germination sur le niveau de désagrégation des malts *Julia* et *Bérac*

	Julia			Bérac		
	3 jours	4 jours	6 jours	3 jours	4 jours	6 jours
Protéines solubles	3,4	3,3	3,3	4,9	4,8	4,5
Indice Kolbach	33	33	33	38	44	41
Hartong 45°	29,9	35,0	35,8	36,9	38,2	42,6
Différence fine-grosse mouture	3,2	1,4	1,2	2,5	1,8	0,9
Viscosité	1,66	1,53	1,49	1,56	1,47	1,44

JOHNSTON (1954) a déjà signalé que la pression de vapeur d'eau dans le malt pour un degré d'humidité donné variait considérablement et par conséquent certains malts séchaient plus facilement que d'autres. Cependant, l'auteur n'a pas du tout cherché les facteurs intervenant dans cette variation.

A la lumière des résultats présentés ci-dessus, essayons maintenant de donner une explication au phénomène observé.

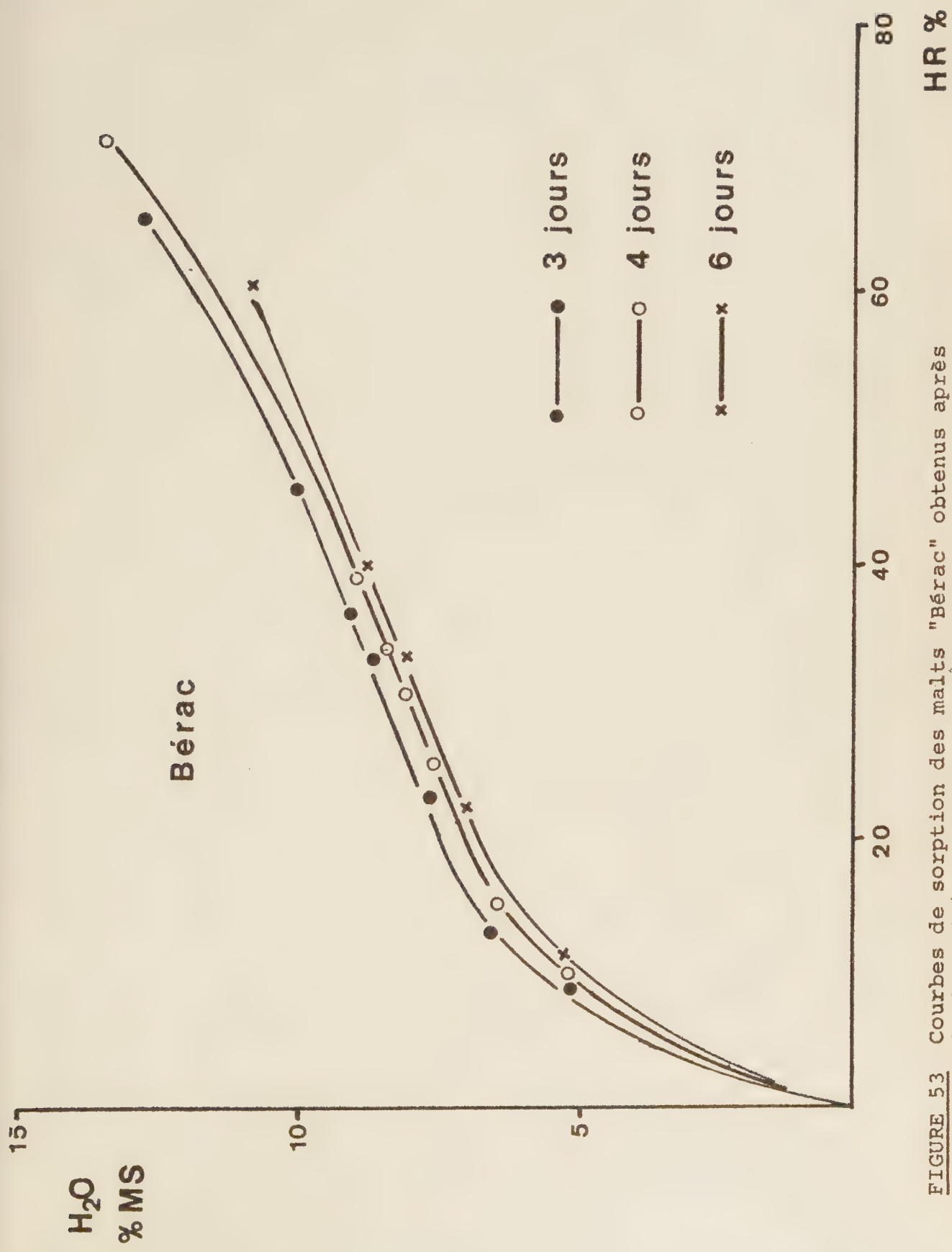


FIGURE 53 Courbes de sorption des malts "Bérac" obtenus après 3, 4 et 6 jours de germination

TABLEAU (XI)

Tableau comparatif des critères analytiques de la désagrégation des malts
provenant de différentes variétés d'orge après 3,4 et 6 jours de germination

Jour de germination	Variété d'orge	Protéines totales	Protéines solubles	Indice Kolbach	Différence fine-grosse mouture	Hartong 45°	Viscosité
3	Julia	10,0	3,4	33	3,2	29,9	
	Carina	9,9	3,7	37	1,6	-	1,66
	Bérac	11,0	4,9	38	2,5	36,9	1,58 1,56
4	Julia	10,0	3,3	33	1,4	35,0	
	Carina	10,0	3,9	39	1,4	-	1,53 1,50
	Bérac	10,9	4,8	44	1,8	38,2	1,47
6	Julia	10,1	3,3	33	1,2	35,8	
	Carina	9,9	3,8	38	0,6	-	1,49 1,47
	Bérac	11,0	4,5	41	0,9	42,6	1,44

Comme on le sait, la germination de l'orge est une période pendant laquelle diverses activités enzymatiques se développent dans le grain et ces activités aboutissent au dédoublement des macromolécules de l'orge telles que l'amidon, les glucanes, les protéines, etc..., conduisant ainsi à la formation des substances de faible taille moléculaire.

Il apparaît ainsi que ces substances auraient une affinité pour l'eau plus faible que celle des macromolécules dont elles sont issues.

A ce sujet, nous trouvons quelques renseignements dans la littérature confirmant cette hypothèse.

Ainsi, les courbes de sorption de l'amidon, de maltotriose et de maltose établies par DRAPRON et GUILBOT (1962 a) montrent que l'affinité de l'amidon pour l'eau est beaucoup plus grande que celle du maltotriose et du maltosé.

D'autre part, HÄGERDAL et LÖFQVIST (1973) comparent la courbe de sorption de la caséine avec celle d'un mélange d'acides aminés reflétant la composition chimique de la caséine. Ils constatent que ces deux courbes se distinguent nettement ; la courbe de caséine possède une pression de vapeur beaucoup plus faible que celle d'un mélange de ces produits de désagrégation.

L'hypothèse émise semble bien plausible.

Envisageons maintenant les résultats comparatifs des courbes de sorption des malts préparés à partir de différentes variétés d'orge, mais dans des mêmes conditions de micromaltage. Cela pourrait nous permettre de connaître s'il y a d'autres facteurs en dehors de la désagrégation, susceptibles d'intervenir sur l'allure des courbes.

D'après les résultats d'analyse conventionnelle présentés dans le tableau (XI), on peut classer les micro-malts dans l'ordre de la dé-

.../...

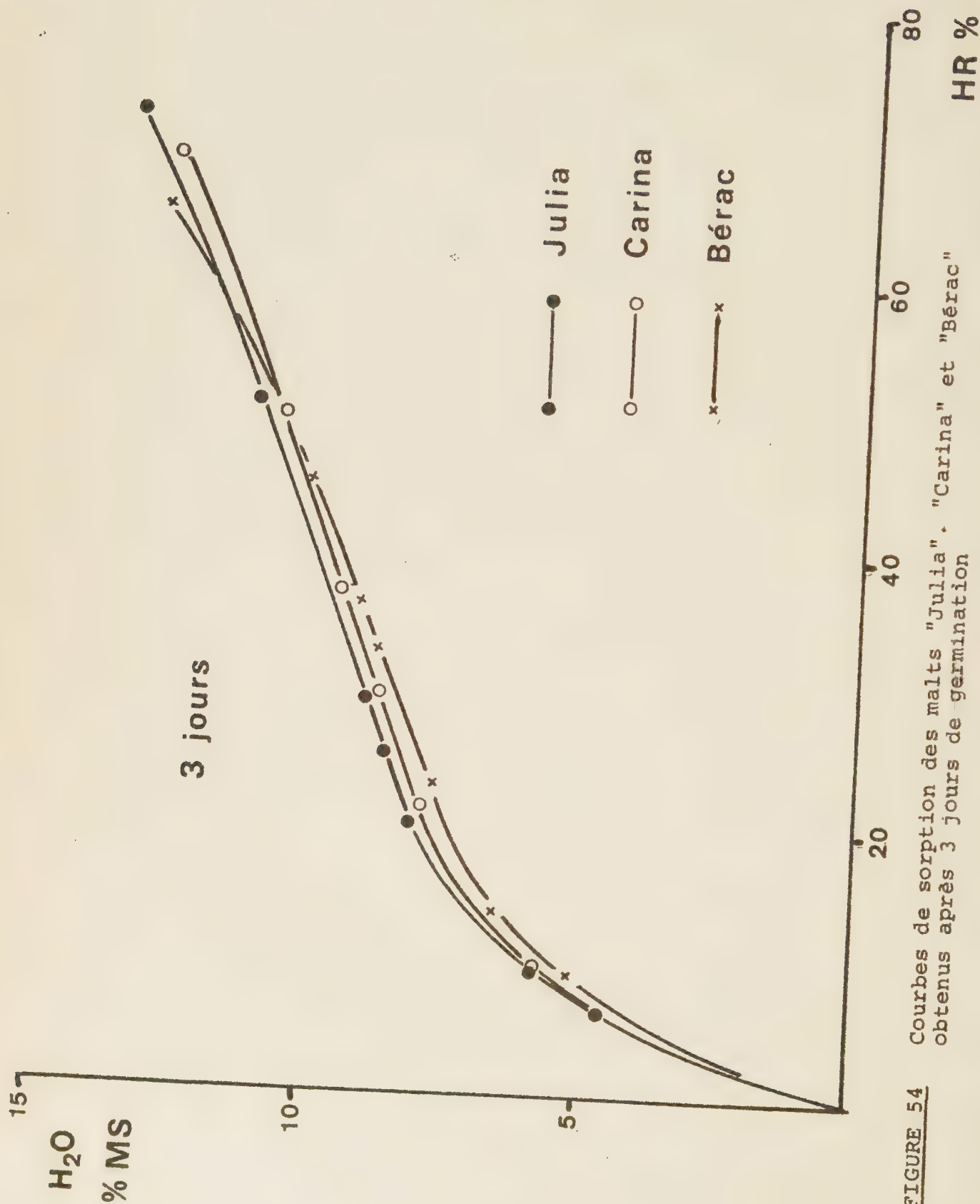


FIGURE 54 Courbes de sorption des malts "Julia", "Carina" et "Bérac" obtenus après 3 jours de germination

sagrégation, selon la variété, de la façon suivante : *Julia* , *Carina* , *Bérac* .

On pourrait donc s'attendre à ce que les courbes de sorption de ces malts présentées sur un même graphique suivent aussi cet ordre.

Les figures (54) , (55) et (56) comparant les courbes de sorption des malts de ces trois variétés d'orge, nous montrent qu'il n'en est pas tout à fait ainsi.

Les courbes relatives aux malts *Julia* et *Carina* sont très semblables bien qu'il existe un écart dû probablement à la différence du niveau de désagrégation ; tandis que les courbes des malts *Bérac* se distinguent nettement des autres variétés, notamment dans les cas de 3 ou 4 jours de germination.

La forme de ces courbes indiquent que dans la zone de l'activité de l'eau allant de 0 aux environs de 0,50, l'affinité pour l'eau du malt *Bérac* est plus faible que celle de *Carina* et de *Julia* et au delà elle augmente progressivement pour leur devenir supérieure à partir de l'activité de l'eau de 0,60. Cependant, cela n'apparaît pas de façon nette dans la figure (56) où nous avons rassemblé les courbes de sorption des malts après 6 jours de germination . Dans la zone de faible activité de l'eau, la courbe de *Carina* et de *Bérac* semblent plutôt confondues et ce jusqu'à environ une valeur de 0,30 à partir de là, la courbe de *Bérac* s'écarte et se rapproche de celle de *Julia*

Ces particularités des courbes de sorption de malts provenant de différentes variétés d'orge ne semblent pas s'expliquer en se basant uniquement sur les critères analytiques de désagrégation. Les caractéristiques variétales, autrement dit, la composition biochimique au sens le plus large du terme, peut avoir une influence sur l'allure de la courbe de sorption.

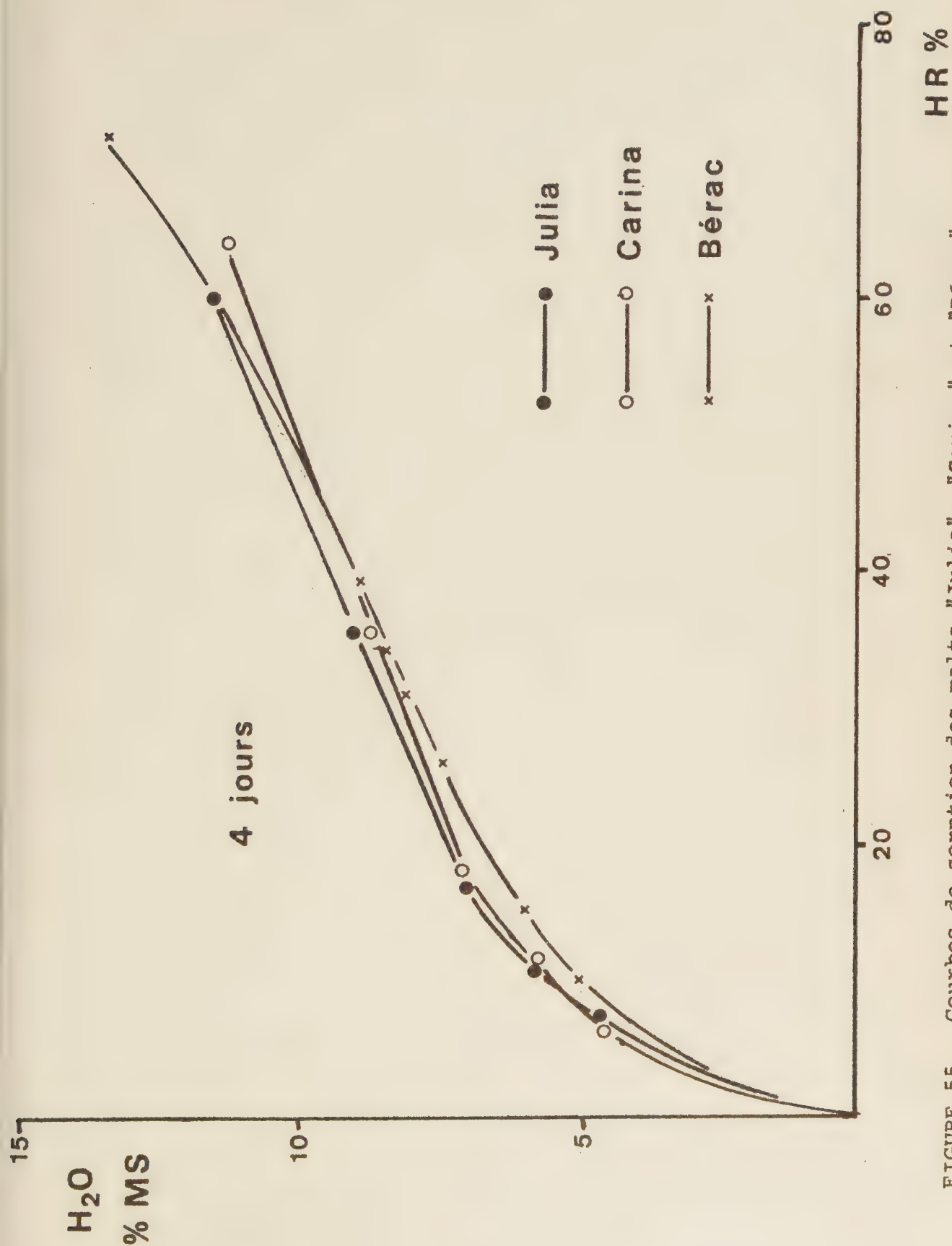


FIGURE 55 Courbes de sorption des malts "Julia", "Carina" et "Bérac" obtenus après 4 jours de germination

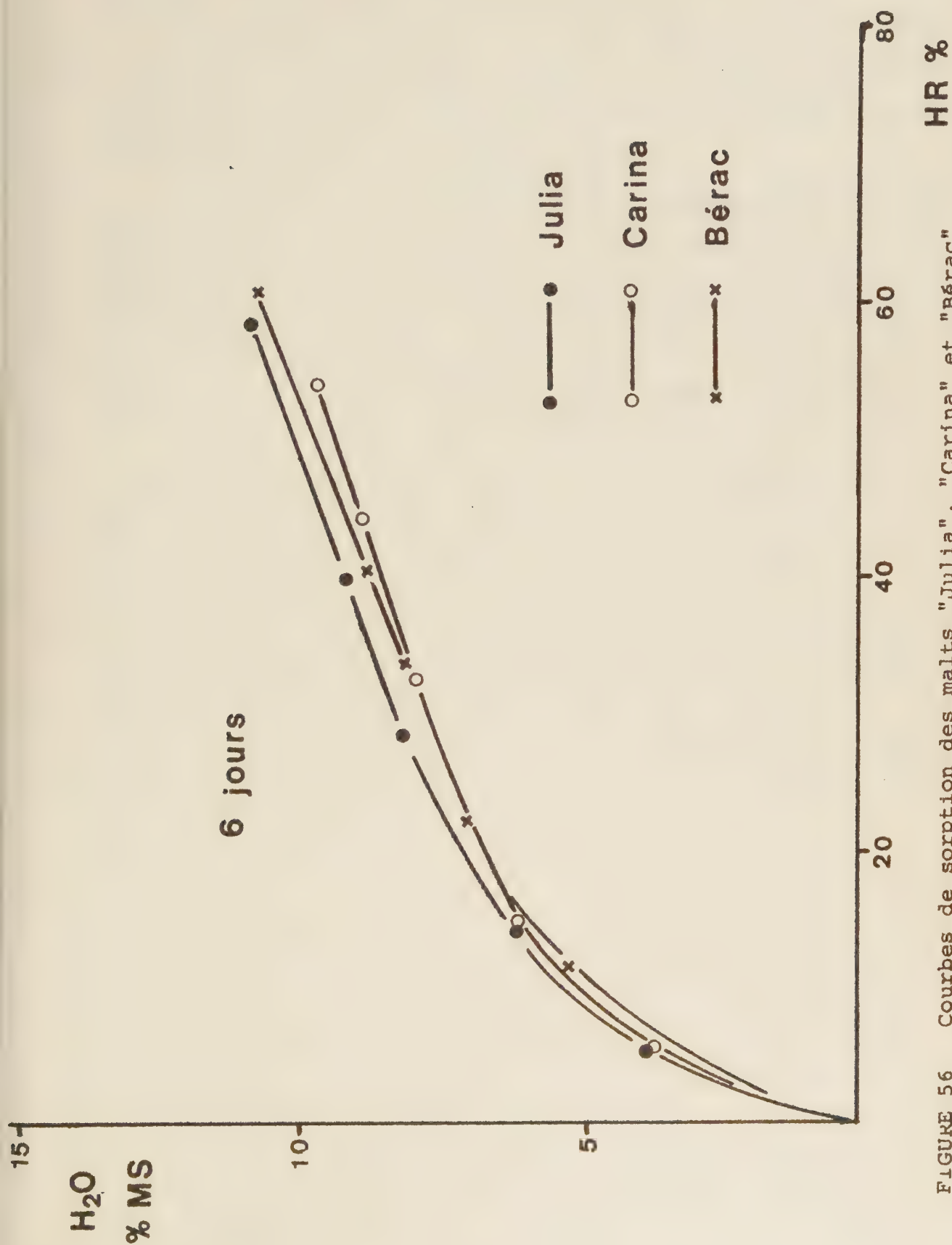


FIGURE 56 Courbes de sorption des malts "Julia", "Carina" et "Bérac" obtenus après 6 jours de germination

Quoiqu'il en soit, les différences observées d'une part entre les malts différemment désagrégés provenant d'une même variété d'orge, d'autre part entre les malts issus de différentes variétés d'orge, s'avèrent d'un intérêt certain dans la pratique pour le malteur, en particulier au niveau du touraillage.

Premièrement, les activités enzymatiques et les réactions chimiques dans le malt vert au cours des conditions déterminées de séchage et du coup de feu vont se manifester d'une manière plus ou moins intense d'une part, selon la variété d'orge au départ, d'autre part, selon l'état de la désagrégation après la germination.

Deuxièmement, ces variations dans la qualité du malt vont jouer un rôle déterminant sur la vitesse de séchage. Par exemple, pour une même variété, un malt bien désagrégué aura tendance à sécher plus facilement qu'un malt relativement moins bien désagrégué.

Dans l'avenir, ces phénomènes de sorption dans le malt en liaison avec les problèmes de séchage devront être étudiés en tenant compte de l'état de "porosité" du malt qui semble lié au niveau de la désagrégation d'après les travaux de HARTONG et KRETSCHMER (1968).

4. ETUDE SUR L'ISOLEMENT ET L'IDENTIFICATION DES CETOSE-AMINES DU MALT

4.1. INTRODUCTION

Dans la première partie de notre exposé, en étudiant le mécanisme des réactions de Maillard, nous avons vu que les aldosylamines formées par la condensation d'un aldose avec un composé aminé subissaient un réarrangement d'Amadori. Les cétose-amines (1-amino-1-déoxy-2-cétoses) ainsi formées se décomposaient en donnant naissance à un grand nombre de produits intermédiaires de nature très diverse selon la voie de décomposition.

Les cétose-amines jouent donc en quelque sorte un rôle de plaque tournante dans le schéma d'évolution des réactions de Maillard. C'est la raison pour laquelle plusieurs auteurs les ont considérées comme les précurseurs d'arômes et de coloration provenant des réactions de Maillard.

De nombreux travaux réalisés pour l'étude des cétose-amines leur isolement notamment à partir de milieux modèles ont permis de connaître le mécanisme de formation et les propriétés diverses de ces composés.

La plupart d'entre elles sont stables à l'état sec pour de longues périodes. Certaines cétose-amines sont stables également en solution aqueuse mais elles se décomposent toutes en milieu alcalin, même à la température ambiante.

Par leur hydrolyse à l'acide dilué, on retrouve le composé aminé initial dans l'hydrolysât, alors que la partie glucidique se décompose pendant cette opération.

Les cétose-amines réagissent d'une manière caractéristique avec les indicateurs rédox tels que l'O.dinitro-benzène, le bleu de méthylène, le 2-6-DPI et le ferricyanure. Dans le cas de cétose-amines provenant des acides aminés, leur réactivité vis-à-vis de la ninhydrine est également très typique.

Un certain nombre de travaux ont été réalisés sur les cétose-amines contenus dans les produits alimentaires et dans les milieux naturels.

ANET et REYNOLDS (1957) ont pu isolé et identifié 11 cétose-amines à partir des purées lyophilisées d'abricot et de pêche stockées pendant 4 à 16 mois à 25°C et à une valeur de HR de 70 %.

Après avoir reconstitué les purées, ces auteurs ont procédé à une extraction à l'éthanol à 80 %.

Les extraits ainsi obtenus ont été passé sur une colonne de résine "Dowex 50-X-4" forme H^+ . Après le lavage à l'eau, la colonne a été reliée à une série de 2 à 4 colonnes de diamètre plus faible contenant la même résine. Les cations retenues sur la première colonne ont été ensuite déplacées avec une solution de 0,075 N de NaOH. Les fractions recueillies ont été examinées par la technique de chromatographie sur papier. Les taches ont été révélées avec une solution de ninhydrine, de nitrate d'argent et de chlorure de triphényltétrazolium.

L'identification des amino-cétoses ainsi isolées a été effectuée soit par l'hydrolyse de l'acide, soit d'après leur ordre de déplacement sur la colonne ou d'après leur valeur R_f en comparant avec ceux des cétose-amines synthétisées et isolées dans les mêmes conditions.

INGLES et REYNOLDS (1958) ont ensuite étudié les cétose-amines des mêmes produits en utilisant la technique de chromatographie sur résine d'échangeuse d'ions selon la technique décrite par MOORE et STEIN (1954) pour la détermination des acides aminés.

A l'aide des composés synthétiques, les auteurs ont pu identifier 8 cétose-amines et 1 aldose-amine parmi les pics obtenus sur le chromatogramme juste avant celui de l'acide aspartique.

BORSOOK et al. (1955) en étudiant l'incorporation *in vitro* des acides aminés dans les protéines des reticulocytes du lapin, ont constaté qu'un groupe de composés contenus dans l'extrait du foie du porc stimulait cette incorporation.

Ils ont, par la suite, démontré que ces substances étaient les cétose-amines qui se formaient dans les tissus à partir des N-glucosides des acides aminés par un réarrangement d'Amadori.

La méthode utilisée par ces auteurs pour l'isolement de ces composés consiste tout d'abord à une extraction à l'acide trichloracétique du foie sec. Les composés aminés sont ensuite isolés à partir de cet extrait par précipitation à l'acétate de plomb. Le précipité recueilli après l'élimination du sel de plomb, a été soumis à un fractionnement par la technique de chromatographie sur une colonne de Dowex 50 forme H^+ .

Après le lavage à l'eau, les cétose-amines retenues sur la résine sont éluées par gradient de pouvoir éluant de 5 solutions de l'acide trichloracétique contenant 0,05 à 0,5 M de l'acide.

En vue de localiser les cétose-amines, les fractions ainsi obtenues ont été soumises à un test de pouvoir réducteur. Ce test est basé sur la réduction du ferricyanure en milieu alcalin et à la température ambiante, et la formation du bleu de prusse par la réaction du ferrocyanure formé avec un sel de fer ferrique.

Les auteurs identifient ensuite les cétose-amines ainsi fractionnées en comparant avec les composés synthétiques préparés et isolés dans des mêmes conditions de chromatographie.

OKUHARA et SAITO (1970) en utilisant la même technique isolent quatre fractions à partir de la sauce de soja. Deux de ces fractions ne donnent pas de réaction positive à la ninhydrine ni au nitrate d'argent ammoniacal. Cependant, les auteurs ont trouvé de l'acide aspartique, de la thréonine, de la serine de l'acide glutamique, du glycolle et de l'alanine dans leur hydrolysate. Les deux autres fractions réagissent avec la ninhydrine mais pas avec le nitrate d'argent ammoniacal. Elles se séparent en cinq constituants par chromatographie sur papier. Cependant, les auteurs ne donnent pas de renseignements sur la nature de ces composés.

BARRET et al. (1967) en étudiant l'influence du touraillage du malt sur la composition en acides aminés du moût conventionnel, constatent un certain nombre de pics qui apparaissent juste avant celui de l'acide aspartique lors de l'analyse chromatographique des acides aminés selon le procédé automatique de STEIN-MOORE.

Ces auteurs observent ensuite que la concentration de ces composés est approximativement deux fois plus élevée dans le malt après le coup de feu que celle du malt avant cette opération. D'autre part, ces composés donnent un certain nombre d'acides aminés par hydrolyse. Ainsi, les auteurs présumant que ces substances seraient de nature peptidique.

Dans une série de travaux sur l'évolution des acides aminés au maltage et au brassage, YOSHIDA et al. (1968, 1969, 1971) constatent également sur le diagramme d'un analyseur automatique d'acides aminés, un certain nombre de composés qui se distinguent des autres acides aminés connus. Ces composés sont élués dans la grande colonne

utilisée pour la séparation des acides aminés acides et neutres, juste avant l'élution des acides dans les conditions classiques de dosage.

Dans leurs travaux ultérieurs (YOSHIDA et al., 1972), ils ont montré que ces substances se formaient dans le malt pendant le touraillage et notamment au coup de feu. Leur concentration dans le malt était également influencée par les conditions de germination.

Les auteurs ont ensuite isolé ces composés à partir d'un extrait de malt et les ont divisés en deux fractions sur une colonne de résine Amberlite CG-120 selon la technique de STEIN-MOORE pour les acides aminés. L'une de ces fractions a été soumise à la chromatographie sur papier. Ainsi, les auteurs ont séparé trois constituants principaux qui ont été ultérieurement purifiés par la technique d'électrophorèse sur papier.

D'après les résultats d'analyse élémentaire, de détermination de poids moléculaire et d'hydrolyse par HCl, ils ont conclu que ces composés étaient les produits du réarrangement d'Amadori : glycinodéoxy-fructose, valino-déoxy-fructose et alanino-déoxy-fructose.

Dans le chapitre 1.2.5. de notre exposé, en tenant compte des observations de YOSHIDA et al. (1972) nous avons calculé les teneurs relatives des cétose-amines du malt à partir des surfaces des pics apparus sur le diagramme de l'autoanalyseur d'acides aminés dans les conditions normales d'analyse. En suivant leur évolution au cours du coup de feu, nous avons montré leur accumulation considérable dans le malt en fonction de la température, de la durée du coup de feu et de l'humidité du malt.

Dans ce chapitre, nous allons essayer d'isoler et d'identifier les cétose-amines du malt en dehors de celles qui sont déjà signalées par YOSHIDA et al. (1972).

4.2. TECHNIQUES EXPERIMENTALES ET RESULTATS

En vue d'isoler les cétose-amines du malt, un extrait aqueux concentré du malt a été soumis à un fractionnement selon le procédé décrit par YOSHIDA et al. (1972) qui est une adaptation à l'échelle préparative de la méthode originale de STEIN et MOORE pour l'analyse des acides aminés.

4.2.1. Préparation de l'extrait de malt

200 g de mouture fine de malt sont mélangés avec 1,2 l d'eau distillée préalablement refroidie à 0°C. Le mélange est soumis à une agitation pendant 1 heure à cette température. Après la centrifugation pour débarrasser des débris, l'extrait est concentré sous vide à 30°C jusqu'à un volume de 50 ml et mélangé avec 50 ml de tampon citrate pH 2,2.

Cet extrait concentré est ensuite filtré sur une membrane millipore de 0,8 μ et soumis à un fractionnement sur une colonne de résine échangeuse de cations (Amberlite CG 120, 100-200 mesh).

4.2.2. Isolement des cétose-amines du malt par chromatographie sur résine échangeuse d'ions

2.1. Préparation de la colonne de résine Amberlite CG 120 forme Na⁺

La colonne chromatographique de 7 x 70 cm thermostatée à 30°C est remplie de la résine Amberlite CG 120 en forme Na⁺. La résine est préalablement mise en forme Na⁺ sur un filtre Buchner selon la technique classique de régénération pour l'analyse des acides aminés.

Cette opération consiste aux traitements successifs de la résine par l'acide chlorhydrique (4N, 9l pour 500 g de résine), par de l'eau, puis par de la soude (2N la même quantité) suivi du rinçage à l'eau. Après avoir répété deux ou trois fois cette série d'opérations, la résine est mise en suspension dans une solution de tampon citrate 0,2 N de pH 4,25 et dégazée sous vide. On l'introduit ensuite dans la colonne de chromatographie et juste avant l'emploi, on l'équilibre avec la solution tampon de la chromatographie.

2.2. Conditions d'élution

Après le dépôt de l'extrait sur la colonne, l'élution est effectuée au moyen d'une solution tampon citrate 0,2 N de pH 3.00. La composition de ce tampon est inspirée de celui qu'on utilise dans l'analyse automatique des acides aminés pour éluer les acides aminés acides, sauf que nous avons baissé le pH de 3,25 à 3,00 en vue d'améliorer la séparation des cétose-amines dans nos conditions.

Le débit d'élution est de 150 ml/h, l'éluat passe par un absorptiomètre enregistreur à 254 nm et il est collecté par fractions de 10 ml à l'aide d'un collecteur automatique.

2.3. Etablissement des courbes d'élution

- Test à la ninhydrine

Dans un tube à essai, on mélange 0,1 ml de chaque fraction et 0,5 ml de la solution de ninhydrine préparée selon STEIN et MOORE. Le tube est ensuite laissé dans un bain d'eau bouillante pendant 10 minutes. Après le refroidissement, on ajoute 10 ml de l'eau distillée

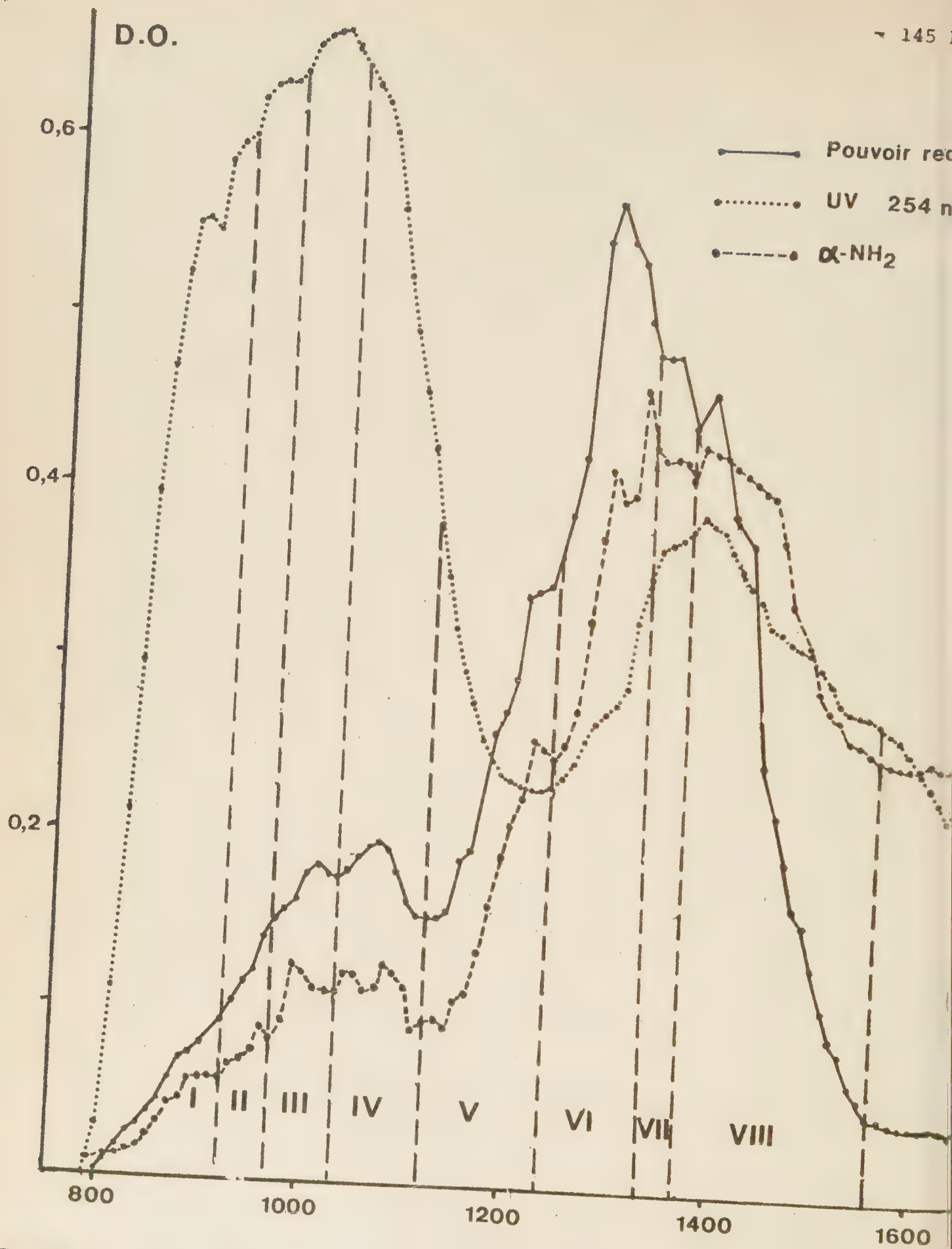


FIGURE 57 Diagrammes d'élution obtenus par la chromatographie sur colonne (7 x 70 cm) de résine Amberlite CG 120 de l'extrait du malt.

**Volume d'élution
(ml)**

dans le tube et on mesure la D.O. à 570 nm.

- Test de pouvoir réducteur

0,1 ml de chaque fraction est soumis à un test de pouvoir réducteur selon la méthode de ADACHI décrite dans le chapitre 5.3.2.

Les résultats obtenus à partir de ces tests ainsi que ceux enregistrés par l'absorptiomètre nous ont permis d'établir les courbes d'élution qui ont été présentées dans la figure (57).

Bien que la séparation des pics ne soit pas parfaite, la superposition des courbes obtenues par ces trois tests nous permet de déterminer les fractions contenant les cétose-amines.

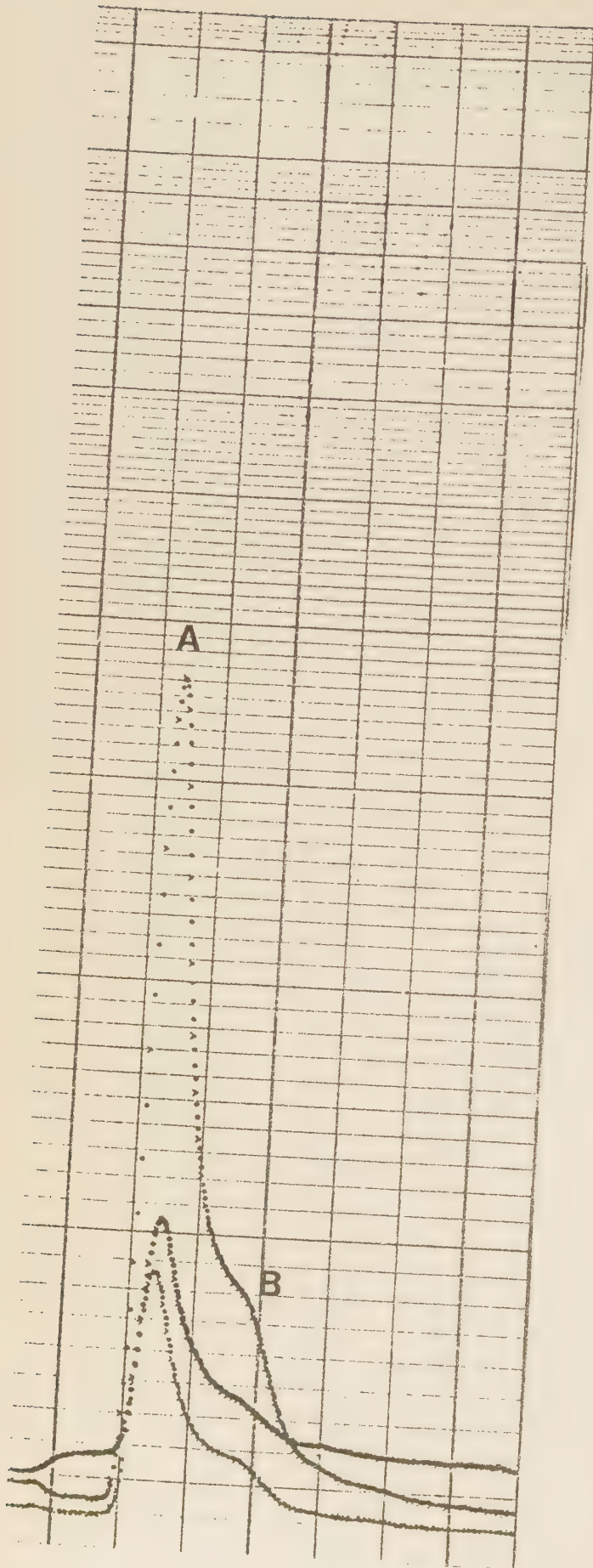
En effet, nous voyons apparaître ces substances dans l'éluat, à partir d'un volume d'élution de 800 ml par une absorption en UV et une réaction positive à la ninhydrine et au ferricyanure. Et puis vers 1600 ml on ne trouve plus de substances réductrices dans l'éluat bien qu'il donne encore une réaction positive à la ninhydrine. Cela explique que, à partir de là, les substances éluées sont notamment les acides aminés. C'est la raison pour laquelle nous avons arrêté l'élution lorsque l'éluat ne donnait plus de réaction positive au ferricyanure.

Nous avons ensuite regroupé les fractions en 8 parties, d'après les indications des courbes d'élution.

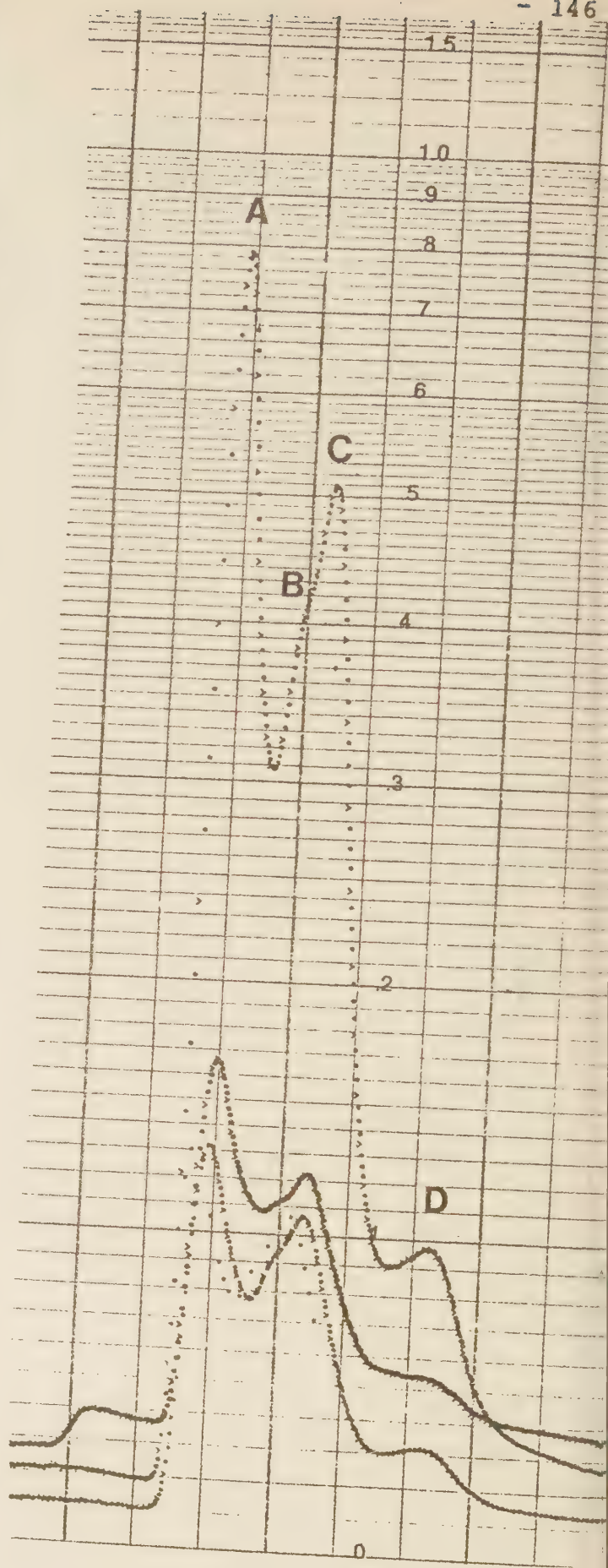
Environ 10 ml de chacune de ces parties ont été analysés au moyen d'un autoanalyseur d'acides aminés JEOL, pour vérifier si les substances isolées correspondaient bien aux pics de cétose-amines qui apparaissent sur le diagramme.

Les figures (58 a,b,c,d,e,f,g,h) reproduisent les résultats obtenus.

La fraction I donne un pic principal que nous nommerons pic A; son léger épaulement signifie la présence d'un autre pic nommé B.



a - Fraction I



b - Fraction II

FIGURE 58

Diagrammes de l'autoanalyseur JEOL obtenus par l'analyse des différentes fractions.

La fraction II contient en quantité abondante des composés correspondant au pic A. Le pic B semble confondu avec le pic C contenu dans cette fraction. Nous constatons d'autre part l'apparition d'un autre pic dans ce diagramme.

La fraction III donne trois pics correspondant aux pics A, C et D. La surface du pic A est inférieure à celle du pic C. Les composés correspondant au pic D commencent à devenir importants dans cette fraction.

Les principaux pics de la fraction IV sont les pics C et D. La quantité relative des substances qui correspondent au pic A est moins importante par rapport aux fractions précédentes. D'autre part, nous voyons apparaître un nouveau pic E dans cette fraction.

La fraction V contient essentiellement les substances donnant les pics D et E sur le diagramme. Un nouveau pic F apparaît également dans cette fraction.

Dans la fraction VI nous trouvons principalement les pics D et F. Cette fraction contient en outre de l'acide aspartique.

Dans les fractions VII et VIII la quantité des acides aminés devient abondante, bien que ces fractions contiennent des composés correspondant aux pics D et F.

A partir de ces résultats, nous constatons dans nos fractions la présence d'un groupe de composés donnant en total six pics sur le diagramme de l'autoanalyseur.

Nous avons ensuite analysé un extrait préparé à partir du même malt, au moyen de l'autoanalyseur, dans les mêmes conditions opératoires.

Le diagramme présenté dans la figure (59) met en évidence la présence de six pics correspondant d'après les valeurs R_f aux pics que nous avons trouvés dans nos fractions.

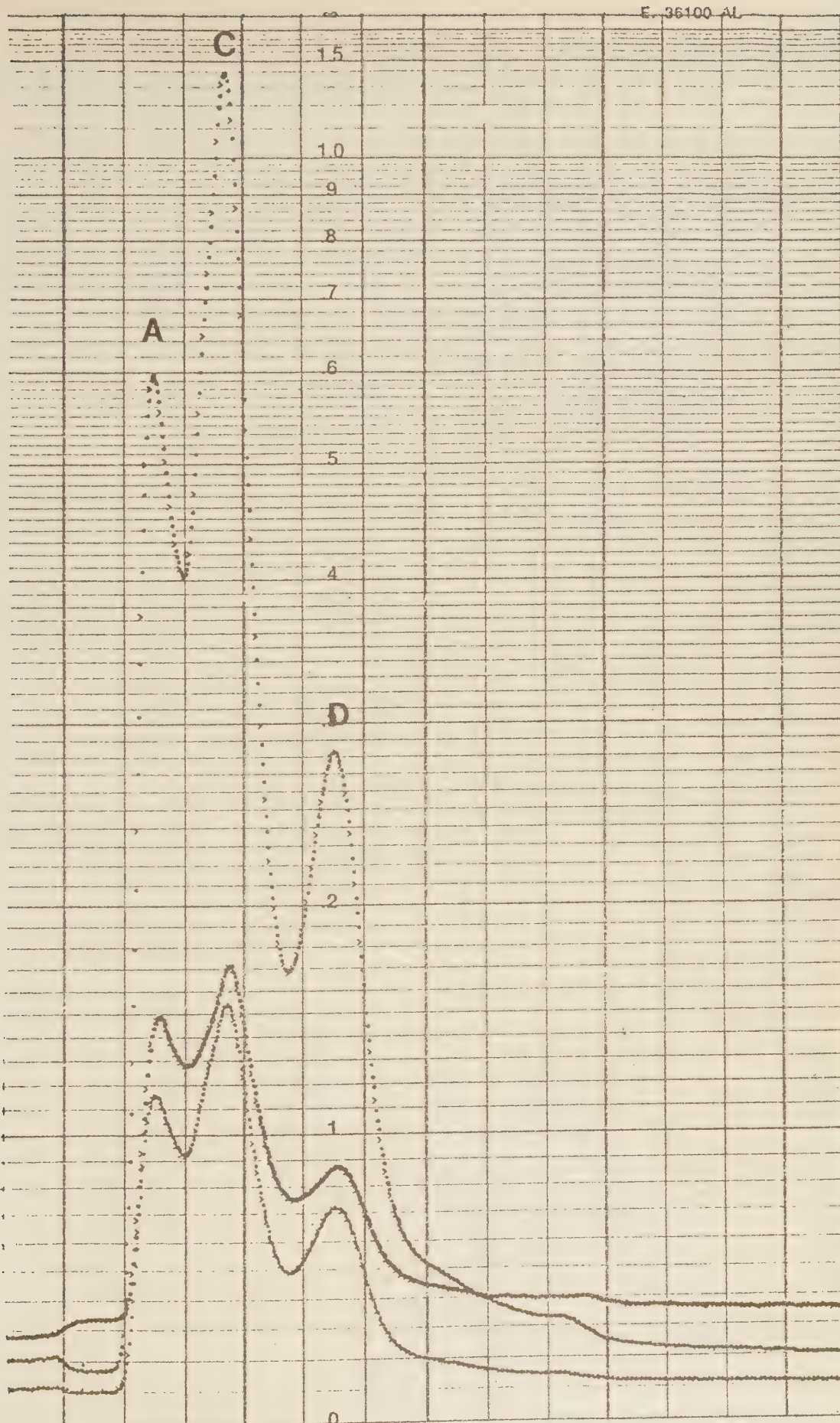


FIGURE 58 c Fraction III

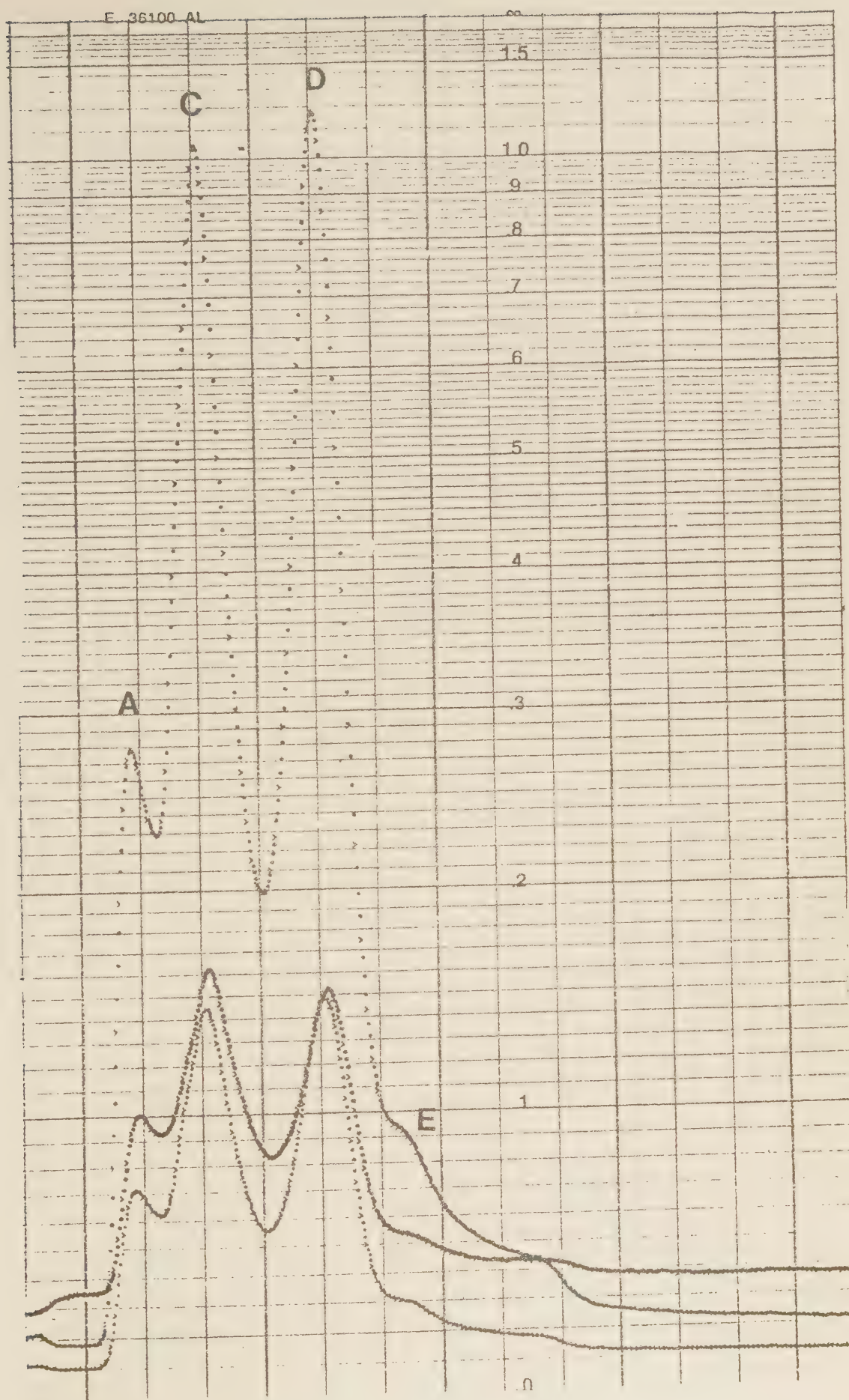


FIGURE 58 d Fraction IV

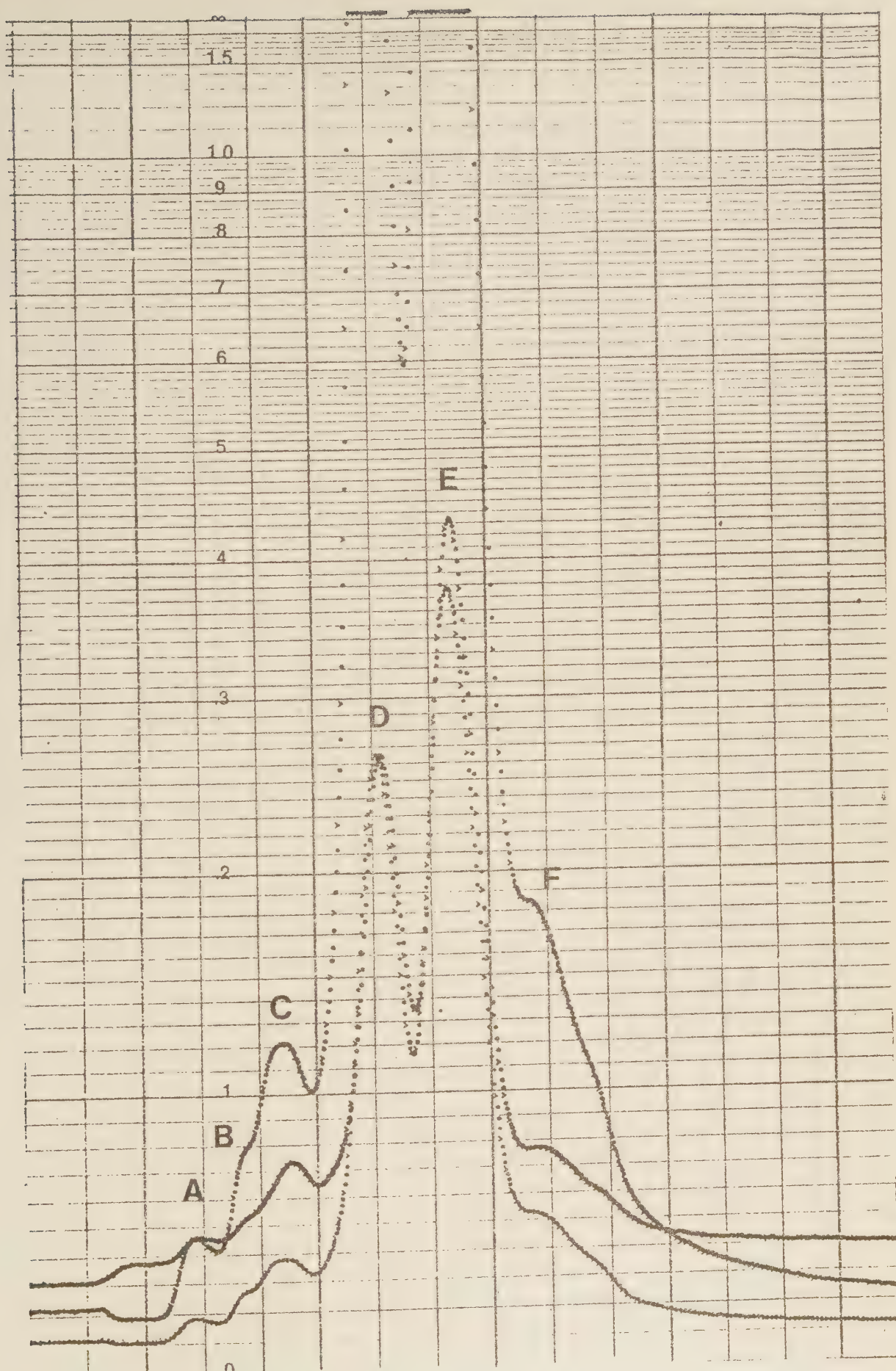


FIGURE 58 e Fraction V

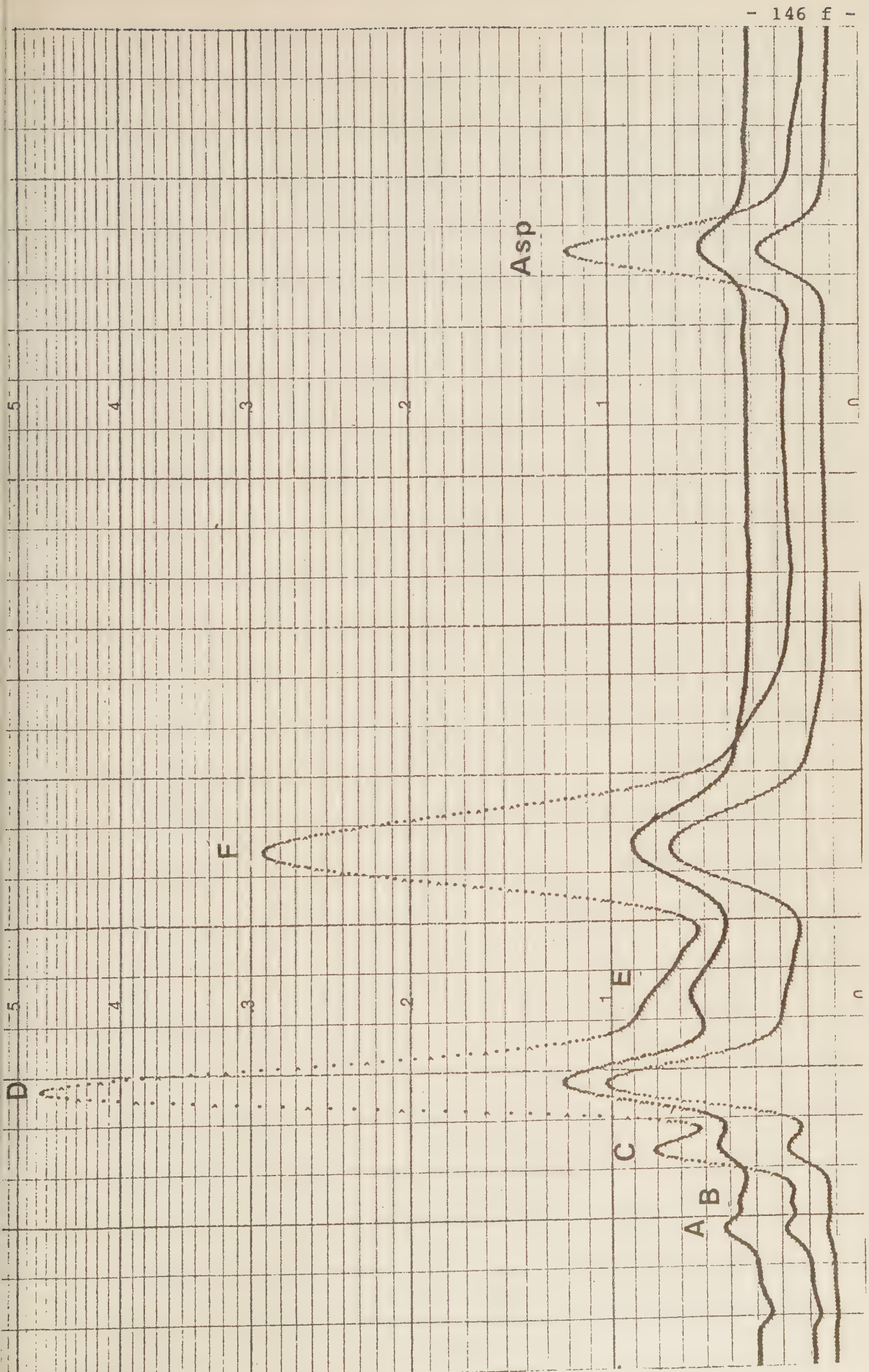


FIGURE 58 f Fraction VI

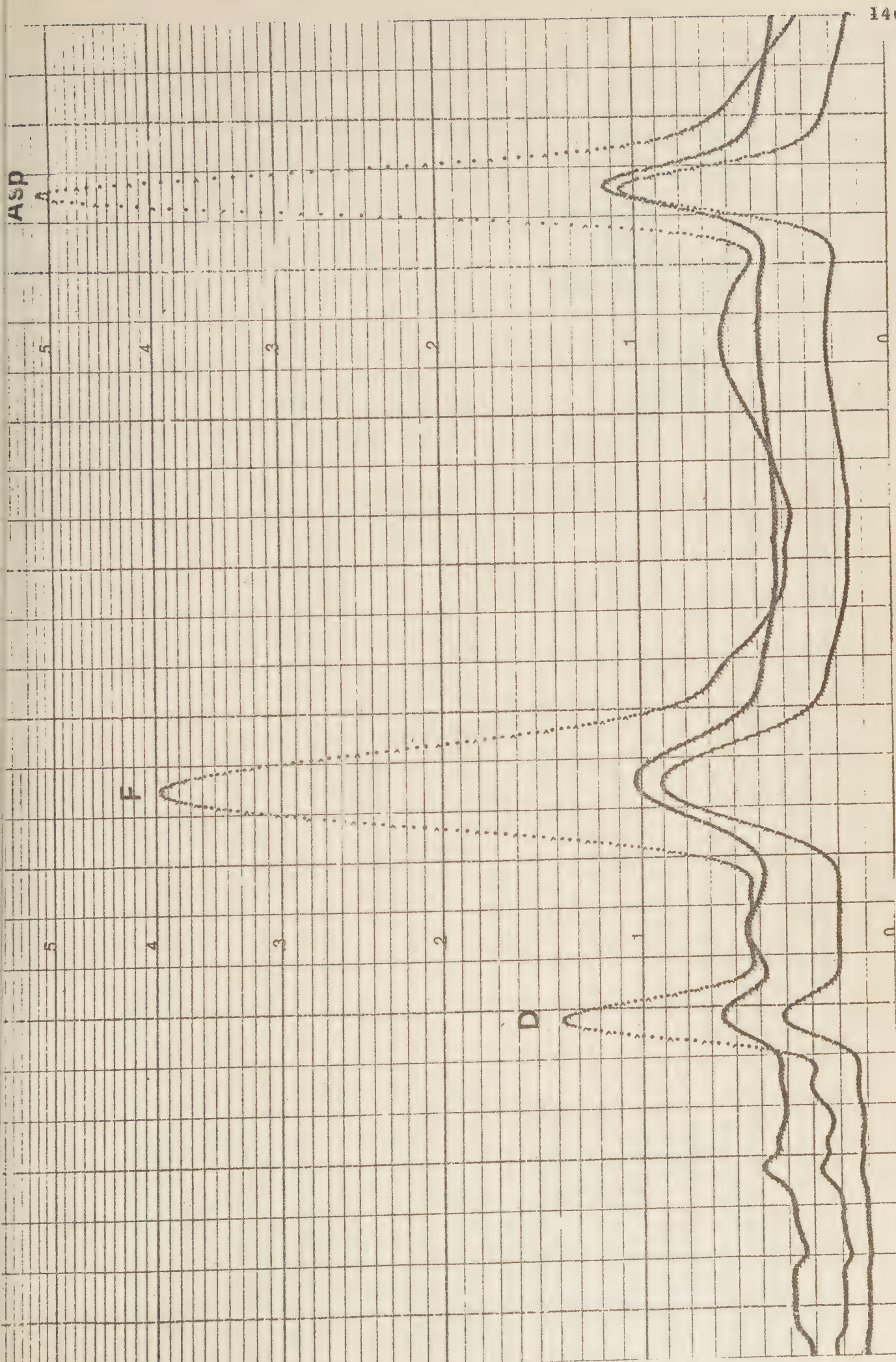


FIGURE 58 g Fraction VII

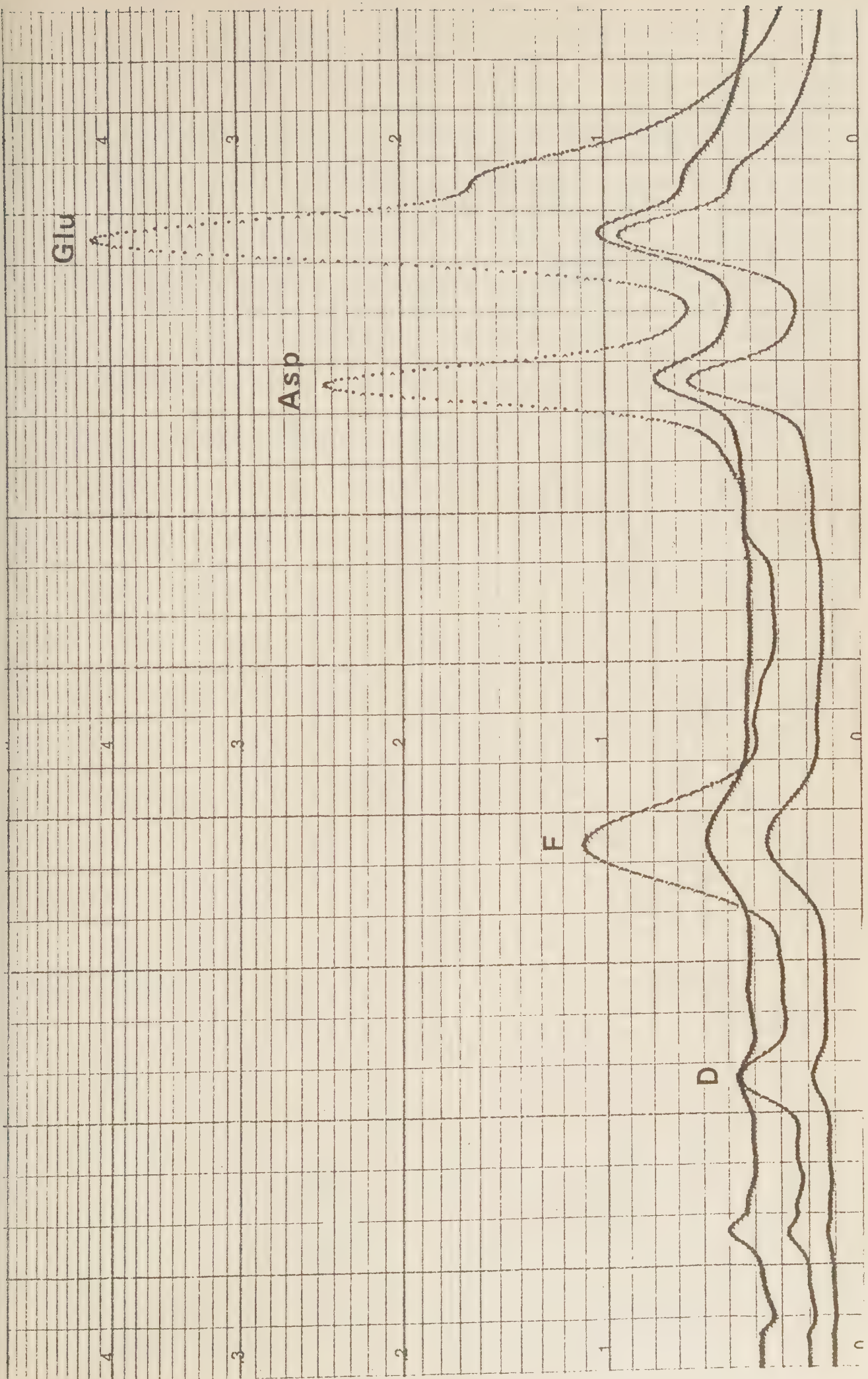


FIGURE 58 h Fraction VIII

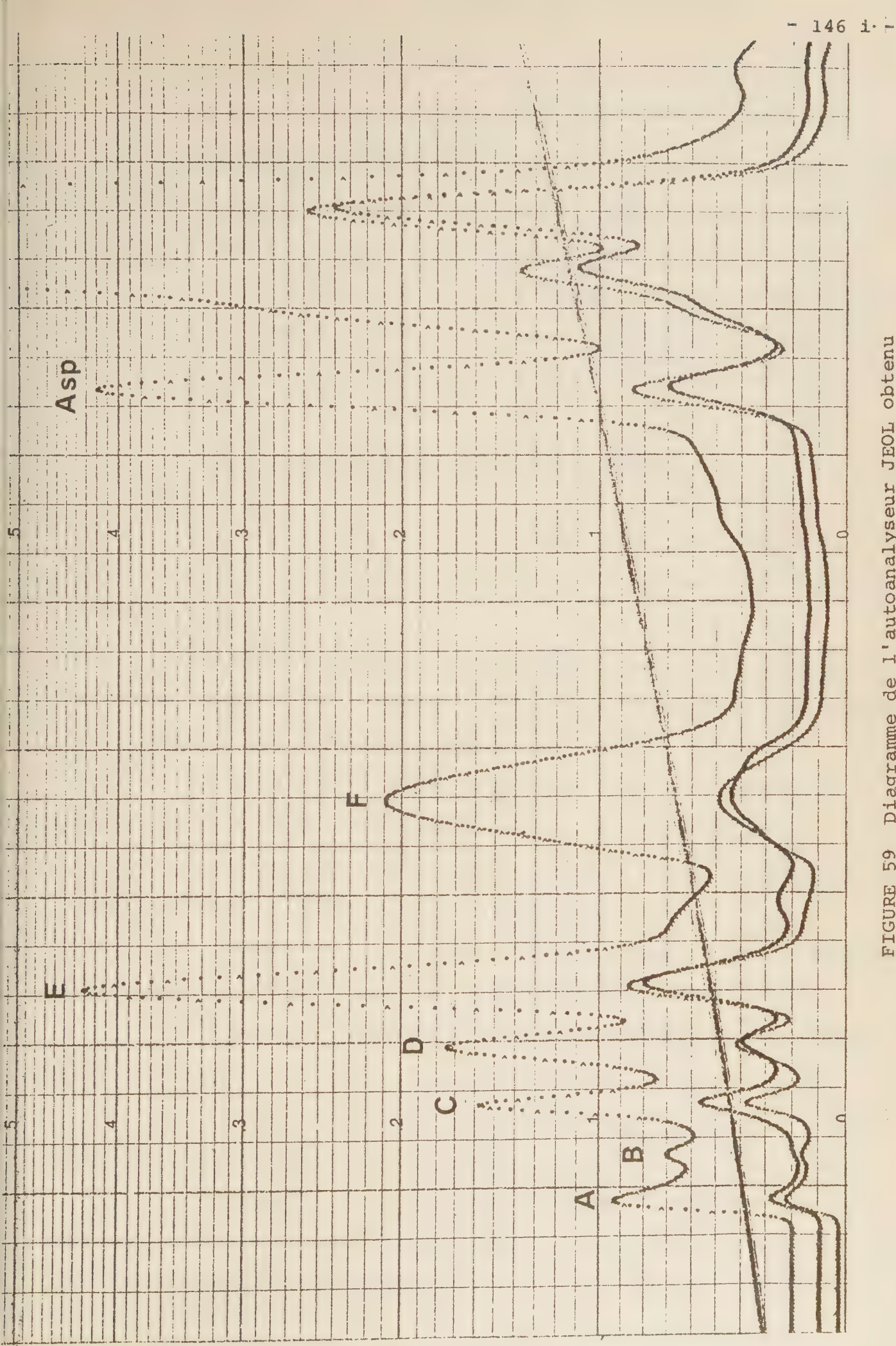


FIGURE 59 Diagramme de l'autoanalyseur JEOL obtenu par l'analyse directe de l'extrait du même malt.

Cela montre qu'en fractionnant un extrait de malt selon la technique décrite ci-dessus, nous avons pu isoler tous les cétose-amines qui sont élués avant l'acide aspartique.

Cependant, chacune de ces fractions obtenues donne plusieurs pics sur le diagramme de l'autoanalyseur. D'autre part, il n'est pas évident que ces pics ne correspondent qu'à une seule substance.

4.2.3. Dessalage des fractions isolées

Afin de pouvoir isoler les constituants de chacune de ces fractions, nous avons procédé à une série de chromatographie préparative sur papier.

Auparavant, les fractions ont été soumises à un dessalage sur une colonne de résine Amberlite CG 120 en forme H^+ ; cela permet la réalisation des chromatogrammes corrects.

Les colonnes utilisées à cet effet ont un diamètre de 3 cm et la hauteur de la résine dans la colonne est de 30 cm.

Après la régénération de la colonne, les différentes opérations de dessalage s'échelonnent ainsi :

- passage de la solution à dessaler dont le pH est ajusté à une valeur 2,2 par l'addition de la solution diluée de HCl
- lavage de la colonne à l'eau distillée jusqu'à la neutralité de l'éluat
- élution des substances absorbées sur la résine à l'aide d'une solution de NH_4OH 0,5 N.

On recueille ainsi environ 300 ml de l'éluat alcalin qui est par la suite soumis à une évaporation jusqu'au sec, sous vide à 30°C pour éliminer l'ammoniaque.

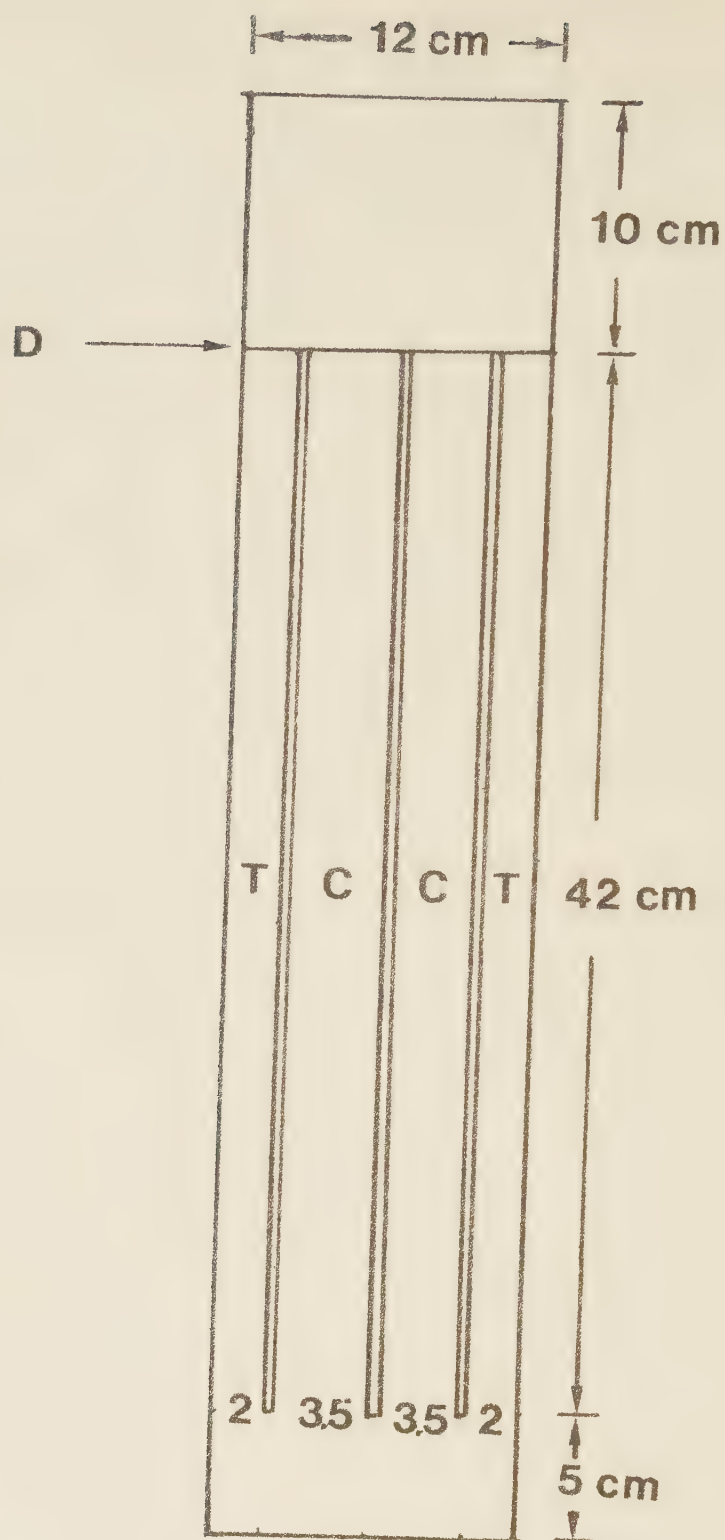


FIGURE 60 Schéma de la feuille de papier de chromatographie
Whatman 3 MM.

T - Bandelette témoin
C - Bandelette centrale
D - Dépôt

Le résidu sec obtenu est dissout dans 5 ml de l'eau distillée et cette solution est utilisée pour l'étude préparative de chromatographie sur papier.

4.2.4. Isolement des constituants des différentes fractions de cétose-amines par la chromatographie préparative sur papier

A cet effet, nous avons suivi le procédé décrit par YOSHIDA et al. (1972).

Environ 100 μ l de la solution dessalée ont été déposées sur une feuille de papier Wathman 3 MM, découpée comme il est indiqué dans la figure (60). Le développement des chromatogrammes a été réalisé selon la technique descendante en utilisant comme solvant le mélange de butanol-acide acétique-eau (2/1/1, V/V). La durée du développement était de 20 heures.

Après le séchage à l'air des chromatogrammes, les bandelettes témoins ont été découpées. L'une d'elles a été révélée en pulvérisant une solution de 0,2 % de la ninhydrine, dans du butanol, additionnée de 5 ml de la collidine, tandis que la révélation de l'autre a été effectuée selon le procédé décrit par BORSOOK et al. (1955).

Ainsi, les zones des différentes cétose-amines ont été repérées sur les bandelettes centrales.

Ces zones ont été découpées en vue d'éluer par la suite ses constituants.

Ainsi, une dizaine d'échantillons de chaque fraction a été soumise à la chromatographie, et en total, 9 constituants ont été isolés.



TABLEAU (XII)

Les valeurs Rf des constituants isolés à partir des six fractions
de cétose-amines par la chromatographie sur papier

Rf	Fractions					
	I	II	III	IV	V	VI
0,10	-	-	-	+	+	+
0,15	+	+	-	-	+	+
0,23	+	+	-	+	+	+
0,35	+	+	-	+	+	+
0,42	+	+	-	+	+	+
0,48	+	+	+	-	+	+
0,52	-	-	+	+	-	-
0,63	-	+	+	-	+	+
0,73	+	+	+	+	+	+

Le tableau (XII) donne les valeurs Rf de ces constituants isolés à partir de six fractions de cétose-amines.

Elution des chromatogrammes

Les coupures des chromatogrammes correspondant à la même valeur Rf, obtenues à partir de différentes fractions sont placées dans un erlen de 500 ml contenant 250 ml d'eau distillée. Après agitation pendant une heure au moyen d'un agitateur magnétique, le contenu de l'erlen est filtré sur un verre fritté. Lorsque la filtration est complète, la couche est lavée à plusieurs reprises à l'eau distillée.

Le filtrat est ensuite évaporé à sec, sous vide à 30°C, repris dans un petit volume d'eau (5ml) et lyophilisé.

4.2.5. Purification et séparation ultérieure des constituants par l'électrophorèse sur papier

Pour purifier les trois constituants de la fraction A II de cétose-amines, YOSHIDA et al. (1972) ont utilisé la technique d'électrophorèse à haute tension sur papier. D'autre part, ANET (1959) avait déjà utilisé cette technique pour la séparation de mono-cétose-amines et di-cétose-amines à partir d'un milieu modèle.

En effet, cette technique convient très bien pour la séparation des corps de faible poids moléculaire tels que les peptides, acides aminés, les oses, etc...

A défaut de l'équipement que nécessite la technique de l'électrophorèse à haute tension, nous avons été amenés à mettre au point une méthode électrophorétique à basse tension en vue de la séparation



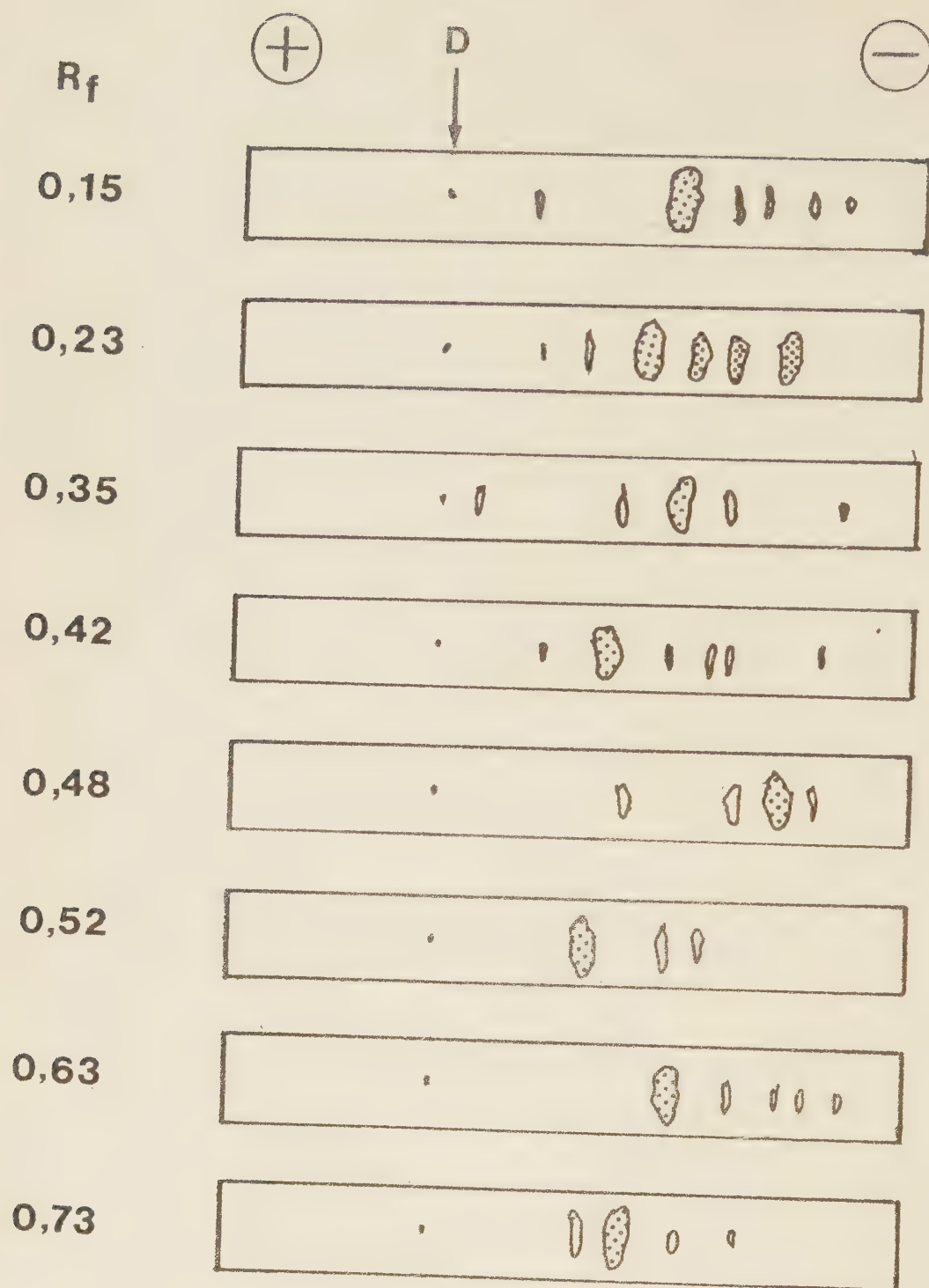


FIGURE 61

Electrophorégrammes semi-schématisés de différentes cétose-amines isolées d'après leur valeur R_f en chromatographie sur papier.

D - Dépôt

ultérieure des cétose-amines que nous avons isolées par la chromatographie sur papier.

Après une étude préliminaire des divers paramètres, les meilleurs résultats sont obtenus pour les conditions suivantes :

Le tampon d'électrophorèse à pH 1,9 couramment utilisé pour la séparation des acides aminés a pour composition :

- acide formique (25 %) 26 ml
- acide acétique glacial 58 ml

Le mélange est ensuite complété à 2 l.

Après le dépôt de l'échantillon (environ 40 µl) sur la ligne de départ en deux positions d'une feuille de 10 x 40 cm de papier Whatman N 3MM, la migration électrophorétique sous 800 volts dure 4 heures.

Les électrophorégrammes sont ensuite séchés à l'air et découpés en deux bandelettes latérales ; l'une d'elles est utilisée pour la révélation en pulvérisant de la solution obtenue.

La figure (61) illustre les résultats obtenus.

Tous les constituants isolés par chromatographie sur papier se déplacent vers la cathode dans l'électrophorèse et la plupart d'entre eux donne une seule tache principale et quelques impuretés. Le constituant ayant une valeur R_f de 0,23 donne quatre taches.

Ainsi, une dizaine d'échantillons de chaque constituant a été soumise à l'électrophorèse et les zones correspondantes aux taches sur la bandelette non révélée ont été découpées. Les fragments ont été ensuite élués par la technique décrite ci-dessus. Les ~~élués~~ ^{élués} ont été évaporés et lyophilisés.

Les lyophylisats ont une coloration jaunâtre, et ils sont légèrement hygroscopiques.

Les quantités de constituants ainsi isolées sont rassemblées dans le tableau (XIII)

TABLEAU (XIII)

Rf	Poids (mg)
0,15	10,50
0,23 (0,60)	29,90
0,23 (0,72)	6,95
0,23 (0,82)	7,75
0,23 (1,00)	7,50
0,35	7,80
0,42	2,45
0,48	1,20
0,52	2,35
0,63	1,40
0,73	1,85

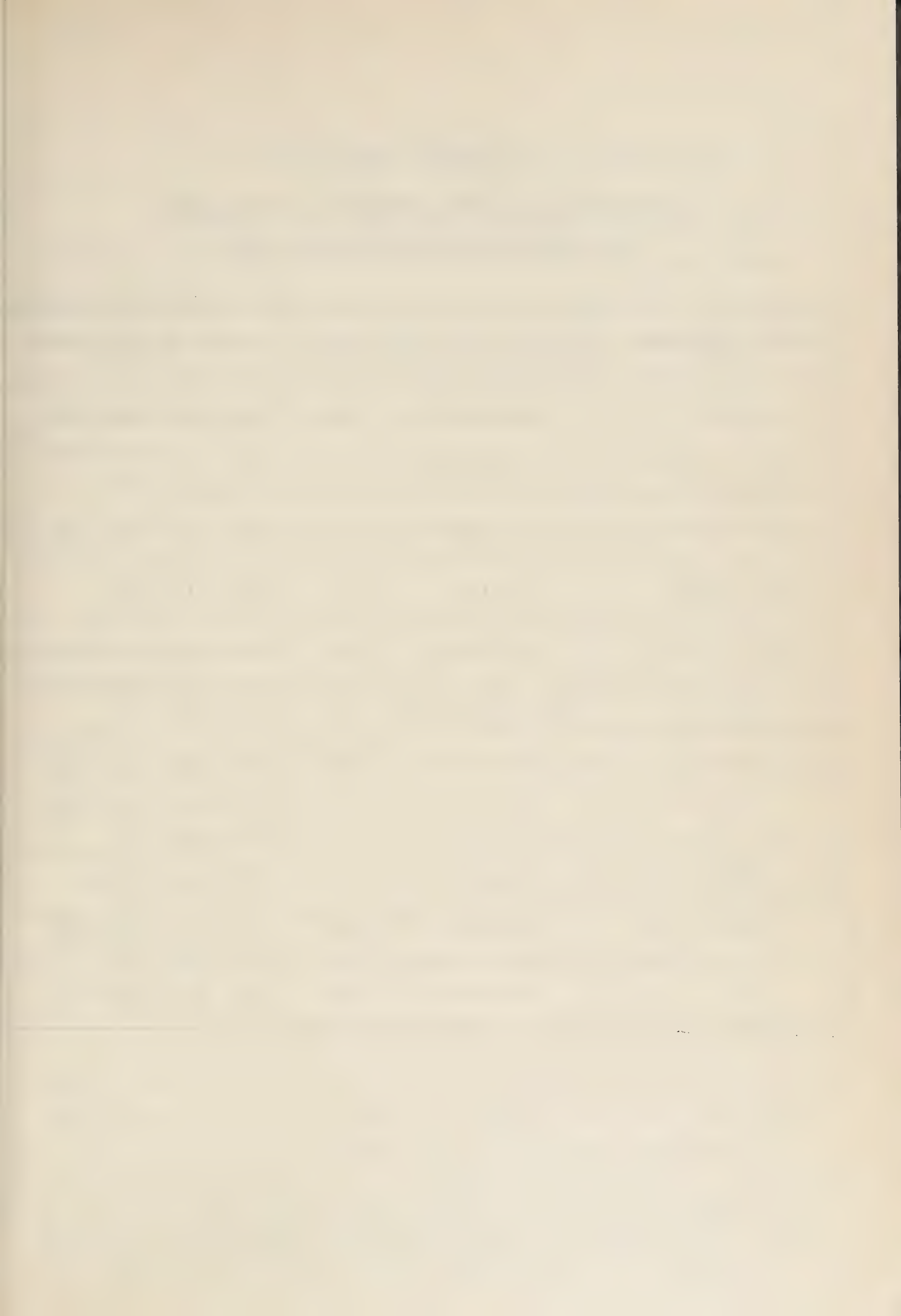


TABLEAU (XIV)

Composition en acides aminés des hydrolysats
des fractions cétose-amines du malt

Rf des substances isolées	Acide aminé principal : (% d'acides aminés totaux)	Autres acides aminés trouvés
0,15	Glycocolle : 71	Glu, Ala, Ser, Thr.
0,23 - 0,60	Acide aspartique : 73	Ala, Glu, Gly.
0,23 - 0,72	Acide glutamique : 55	Pro, Asp, Thr, Ser, Gly
0,23 - 0,82	Valine : 51	Leu, Ile, Thr.
0,23 - 1,00	Alanine : 62	Glu, Ser, Gly, Asp, Thr
0,35	Acide glutamique : 79	Thr, Pro, Asp, Ser, Gly, Ala.
0,42	Valine : 86	Leu, Ile, Glu, Gly, Ala, Thr, Ser, Asp.
0,48	Alanine : 52	Glu, Ser, Gly, Asp, Thr, Leu, Ile.
0,52	Isoleucine : 53	Leu, Glu, Ser, Gly, Asp, Ala.
0,63	Valine : 65	Leu, Glu, Ser, Ile, Gly, Ala, Asp, Thr.
0,73	Leucine : 74	Ser, Glu, Gly, Asp, Thr, Ala.

4.2.6. Essais d'identification des cétose-amines

En premier lieu, nous avons essayé d'effectuer l'analyse élémentaire des substances isolées au moyen d'un analyseur PERKIN ELMER 240 S 3 *.

En raison d'une part de l'hygroscopicité des échantillons et d'autre part de la présence d'un résidu minéral observé après la combustion des échantillons, nous n'avons pu obtenir des résultats concluants.

L'examen spectrophotométrique en infra-rouge * n'a pas non plus apporté de précisions sur la structure chimique de ces composés pour les mêmes raisons.

Nous avons alors soumis les échantillons à l'hydrolyse par HCl 2N à 100° pendant 4 heures. Les hydrolysats ont été par la suite analysés sur l'autoanalyseur JEOL en vue de connaître leur composition en acides aminés. Ce procédé ne nous permet cependant pas d'identifier la partie glucidique des cétose-amines, car cette dernière se décompose pendant l'hydrolyse.

Les résultats d'analyse d'acides aminés ont montré que chacune des fractions isolées contenait plusieurs acides aminés. Néanmoins, nous avons constaté que dans chaque hydrolysate, la quantité relative de l'un des acides aminés était largement supérieure aux autres acides aminés.

Ainsi, à partir des résultats obtenus, nous avons établi le tableau (XIV) qui indique l'acide aminé principal trouvé dans l'hydrolysate, son pourcentage par rapport à la teneur totale en acides aminés et d'autres acides aminés trouvés dans le même hydrolysate pour

* Nous tenons à remercier le Professeur C. LESPAGNOL du Laboratoire de Chimie de Synthèse des Médicaments à la Faculté de Pharmacie de Lille, qui a mis à notre disposition les appareils nécessaires pour cette étude ainsi que Monsieur C. DENIS qui a effectué les analyses.

chacune des substances isolées d'après leur valeur Rf ou leur mobilité électrophorétique.

Ce tableau nous permet de faire les constatations suivantes :

La technique de purification et de séparation que nous avons utilisée n'a pas été suffisamment efficace pour obtention des cétose-amines pures à partir du malt ; ce qui est une cause supplémentaire pour fausser les résultats d'analyse élémentaire.

D'une manière globale, on trouve tous les acides aminés acides et neutres du malt à l'exception de la méthionine, la tyrosine et la phénylalanine dans les hydrolysats de cétose-amines. Les acides aminés basiques qui sont particulièrement réactifs dans les réactions de Maillard sont absents dans ces hydrolysats.

Cela peut être dû au fait que les cétose-amines comportant ces acides aminés dans leurs molécules ne sont pas éluées dans les conditions de la chromatographie sur résine d'échange d'ions que nous avons retenues dans ce travail.

Parmi les cétose-amines isolées, certaines contiennent le même acide aminé principal. C'est le cas notamment des cétose-amines ayant les valeurs Rf de 0,23 (0,82), 0,42 et 0,63 qui donnent de la valine par hydrolyse. D'autre part, l'alanine se trouve comme acide aminé principal dans deux cétose-amines ayant différentes valeurs de Rf, la même chose en ce qui concerne l'acide glutamique.

Cela peut être expliqué par la différence de nature de la partie glucidique de ces composés. A ce sujet, nous n'avons malheureusement pas pu obtenir des renseignements expérimentaux qui auraient pu nous permettre de confirmer cette hypothèse. Cependant, INGLES et REYNOLDS (1958) ont montré que les produits de réarrangement d'Amadori provenant de la réaction de la glycolle avec le xylose, fructose et

glucose sont élués avant l'acide aspartique dans les conditions des chromatographies des acides aminés d'après la technique de STEIN et MOORE.

4.3. CONCLUSIONS

Les cétose-amines, très importants produits intermédiaires des réactions de Maillard, ont été isolées à partir d'un extrait aqueux du malt en utilisant la technique de chromatographie sur colonne de résine échangeuse de cations et de chromatographie préparative sur papier. Après la purification de ces composés par la technique d'électrophorèse sur papier, nous avons tenté de les identifier.

Les résultats d'analyse élémentaire et de spectrophotométrie en infra-rouge, ne nous ont pas permis de tirer des conclusions valables, étant donné le degré de pureté très médiocre des composés isolés.

Seule l'analyse des hydrolysats obtenus par traitement à l'acide nous a apporté des précisions sur l'identité des acides aminés inclus dans leurs molécules.

L'hydrolysat de chaque composé isolé contenait plusieurs acides aminés, néanmoins, parmi ces derniers, la concentration relative de l'un était largement supérieure à celle des autres acides aminés trouvés dans le même hydrolysat. Ainsi, les acides aminés principaux trouvés dans les hydrolysats de cétose-amines isolées d'après leur valeur R_f ou leur mobilité électrophorétique étaient respectivement : glycocolle, acide aspartique, acide glutamique, valine, alanine leucine et isoleucine.

La présence d'un même acide aminé dans les différents hydrolysats nous a révélé la possibilité de la différence de nature de la

partie glucidique dans la molécule de cétose-amines.

L'importance des cétose-amines sur le plan technologique en brasserie vient non seulement du fait qu'elles sont précurseurs de la coloration et d'arômes, mais aussi de leurs propriétés réductrices pour le moût et la bière.

Par conséquent, les études sur leur isolement, leur identification et si possible leur dosage dans le malt, dans le moût et dans la bière, devront être entreprises en faisant appel à des techniques mieux appropriées : la chromatographie en phase gazeuse par exemple.

Dans leurs très récents travaux, WOLFROM et al. (1974) ont montré en effet les avantages offerts par cette technique pour l'étude des cétose-amines.

5. RÉDUCTEURS DU MALT ET LEURS RELATIONS AVEC D'AUTRES CRITÈRES ANALYTIQUES

5.1. ORIGINE DES REDUCTEURS DU MALT

La bière renferme un très grand nombre de substances de nature très variée qui sont capables de réduire l'oxygène moléculaire. Ces substances sont souvent désignées sous l'appellation de réducteurs. Leur présence est due aux matières premières, à leur formation au cours de l'ébullition du moût et aux additifs autorisés. Elles peuvent jouer le rôle de précurseur ou au contraire de protecteur dans l'altération de diverses qualités de la bière lorsque celle-ci est en contact avec l'oxygène moléculaire.

Parmi les réducteurs naturels de la bière, la plus grande partie provient des matières premières et plus particulièrement du malt.

On peut distinguer dans le malt, deux principaux groupes de substances réductrices d'origine différente :

- Les produits des réactions de Maillard et des réactions de caramélisation,
- Les dérivés polyphénoliques.

Comme nous l'avons vu au chapitre 1.2.2., le premier groupe de substances se forme dans le malt au cours du touraillage et notamment au coup de feu. Leur accumulation est intimement liée d'une part à la température et à la durée du coup de feu, et d'autre part, à l'humidité du malt.

Le deuxième groupe important de réducteurs du malt sont les composés polyphénoliques dont l'oxydation comme on le sait, peut avoir des conséquences néfastes pour les qualités organoleptiques de la bière.

La richesse d'un malt en polyphénols dépend tout d'abord de la variété d'orge dont il est issu (CHAPON et KRETSCHMER, 1970 ; REINER et NARZISS, 1972). Ces composés ne paraissent pas avoir subi des transformations importantes au maltage (sauf dans le cas des malts colorés fortement touraillés où ils sont partiellement éliminés) (JERUMANIS, 1970). Les conditions d'environnement et climatologiques peuvent influencer également la teneur en polyphénols de l'orge (JACOPSEN et LIE, 1974).

Le malt peut renfermer, en outre, des réducteurs d'autres origines tels que les dérivés sulphydrylés et les sulfites

Les premiers très importants qualitativement, ne sont en général présents qu'à des concentrations négligeables, les seconds, peuvent être importants dans la mesure où le malt est traité au soufre pendant le touraillage.

5.2. METHODES DE DOSAGES DES REDUCTEURS EN BRASSERIE

Puisque le contact de la bière avec l'oxygène moléculaire est matériellement inévitable et que ce contact peut entraîner de nombreux phénomènes indésirables pour la qualité de la bière, il s'est avéré indispensable de posséder une méthode analytique qui permettrait de préjuger le comportement de la bière vis-à-vis de cet oxydant naturel.

Une telle méthode devrait nous donner des indications précises d'une part sur la nature, d'autre part sur la quantité des substances réductrices de la bière. En plus, elle devrait être simple et rapide pour rendre compatible avec une méthode de contrôle courant en laboratoire.

C'est dans ce but là que HARTONG en 1934, proposait une méthode de mesure du pouvoir réducteur du moût et de la bière avec le DPI. D'après l'auteur, la vitesse de décoloration de ce réactif dans le milieu alcalinisé était en relation avec le potentiel rédox.

Basée sur le même principe, mais effectuée au pH normal du moût ou de la bière, la méthode proposée par GRAY et STONE (1939) a trouvé un large champ d'application en brasserie.

Bien que cette méthode, connue sous le nom de Indicator Time Test (ITT), donne des indications utiles au brasseur sur l'état redox du moût ou de la bière, elle a été critiquée à plusieurs points de vue et différentes modifications ont été proposées.

En dehors des inconvénients techniques qui sont en grande partie surmontables comme l'ajustement du pH du moût à une valeur précise, l'utilisation du spectrophotomètre au lieu d'une comparaison visuelle..., cette méthode ne donne surtout pas d'indications sur la nature des substances réductrices ni sur leur concentration, car la vitesse de décoloration de l'indicateur n'est pas proportionnelle à la teneur en réducteurs.

KLOPPER (1956) a mis au point une méthode pour mesurer les réducteurs capables de réduire le DPI en moins de 20 secondes. En faisant réagir une quantité connue de l'indicateur avec 10 ml de bière, il mesure le temps de décoloration total au chronomètre.

En vue d'avoir une image plus complète possible des réducteurs du moût ou de la bière, DE CLERCK et VAN CAUWENBERGE (1956) proposent une méthode spectrophotométrique en utilisant le même réactif. Cette méthode consiste à ajouter un excès de DPI au moût ou à la bière et ensuite à mesurer sa décoloration au spectrophotomètre après différentes durées de réactions. Les résultats s'expriment en quantité de DPI

réduit. Ainsi, en fonction de leur réactivité avec cet indicateur, selon qu'ils sont oxydés en 15 secondes, 5 minutes, et 150 minutes, les réducteurs ont été divisés en réducteurs "immédiats", "rapides" et "lents" par ces auteurs. Les deux premiers groupes comprennent essentiellement les réductones et une partie de mélanoidines, le troisième groupe renferme surtout les polyphénols.

APEL et SCHILFARTH (1958) ont critiqué cette méthode parce que la quantité d'indicateur réduit n'est pas proportionnelle à celle des substances réductrices ; dans les bières faiblement réductrices, l'excès d'indicateur est plus grand en effet, et cela donne une réduction plus rapide.

Ces auteurs ont élaboré, pour éviter cet inconvénient, une méthode où on arrête la réaction après 20 secondes en extrayant l'indicateur non réduit avec de l'éther. On mesure ensuite la D.O de cet extrait au spectrophotomètre. Leurs résultats montrent que l'excès d'indicateur n'a pas d'influence sur la mesure des réducteurs rapides qui sont les plus importants. L'inconvénient des variations d'excès d'indicateur n'est donc pas grave.

Pour éviter les difficultés résultant de l'instabilité de la solution aqueuse de DPI, OWADES et ZIENTARA (1960) ont proposé un autre réactif : le α - α -diphényl β -picrylhydrazyl. Ce réactif est intensément coloré et il se décolore en présence des réducteurs. La réaction est très rapide avec les réducteurs de la bière, elle est presque complète dans les trente minutes. Les réductones, composés sulphydrilés, une grande partie des mélanoidines et 60 % des composés polyphénoliques de la bière, réagissent dans les cinq minutes. Un autre avantage de ce réactif, c'est qu'il ne réagit pas avec les bisulfites.

CASE et THOMPSON (1961) ont fait une étude comparative des méthodes ITT (GRAY et STONE), de KLOPPER et de DE CLERCK-VAN-CAUWENBERGE ; ils montrent qu'en prenant comme mesure le logarithme de l'ITT, on arrive à des résultats semblables à ceux que l'on obtient en mesurant la quantité d'indicateur réduit, et qu'aucune de ces méthodes n'est capable de déterminer la quantité des réducteurs rapides présents. D'autre part, ces trois méthodes, basées sur la mesure de la vitesse de réaction, ne peuvent donner une idée sur le taux d'oxygène que la bière peut absorber.

Etant donné la faible activité du DPI vis-à-vis des composés polyphénoliques, CHAPON et al. (1971) propose un autre oxydant plus énergétique : le complexe α - α' -dipyridyle-Fe (III) (DPFe III).

Une caractéristique intéressante de ce réactif pour une technique colorimétrique, c'est qu'il est pratiquement incolore, tandis que le produit de réduction, le complexe DPFe II est intensément coloré en rouge.

Présentant également une très forte réactivité avec l'acide ascorbique, les réductones, le sulfite et les mélanoidines, le DPFe III convient surtout pour l'étude d'oxydation des substances polyphénoliques. En utilisant cette méthode, on peut mettre en évidence différents types de réactions d'oxydation de ce groupe de composés (LOUIS, 1972).

Dans le cadre du présent travail, nous avons fait appel à la méthode de MITSUDA et SHIKANAI pour le dosage des réductones et à la méthode de ADACHI pour la détermination du pouvoir réducteur total.

Ces méthodes colorimétriques sont peu connues dans notre industrie brassicole, mais elles sont couramment utilisées dans les études des réactions de brunissement en industrie alimentaire.

Dans ce chapitre, nous allons décrire les détails analytiques de ces méthodes et les relations des valeurs trouvées par ces méthodes avec d'autres critères analytiques du malt.

5.3. METHODES ANALYTIQUES

5.3.1. Méthode de dosage des réductones

3.1.1. Principe et historique

La méthode originale de MITSUDA a pour but de doser l'acide ascorbique aussi bien dans les milieux biologiques que dans les produits alimentaires en se basant sur le taux de décoloration d'une solution dans le butanol du DPI par l'acide ascorbique contenu dans l'échantillon.

Le DPI, réactif bien connu en brasserie, est également très largement répandu pour le dosage de l'acide ascorbique dans de nombreux produits alimentaires et pharmaceutiques. Il a été pour la première fois utilisé par TILLMANS et al. (1928) pour doser l'acide ascorbique selon une méthode titrimétrique dans le jus de citron.

Pour éviter les difficultés d'une méthode titrimétrique visuelle BESSEY (1938) et EVELYN et al. (1938) proposent une méthode photométrique où ils mesurent le taux de décoloration du DPI ajouté en excès dans l'échantillon. Cette méthode, identique à celle de DE CLERCK et VAN CAUWENBERGE (1956) pour la détermination des réducteurs en brasserie, permet d'éviter, en limitant le temps de réaction, l'interférence des réducteurs autres que l'acide ascorbique dans le dosage.

La méthode proposée par ROBINSON et STOTZ (1945), en utilisant toujours le même réactif, consiste à extraire le DPI non-réduit dans un volume connu du xylène et mesurer le taux de décoloration du réactif dans ce solvant.

Basée sur le même principe que la méthode de dosage des réducteurs rapides de APEL et SCHILFARTH (1958), cette méthode rend possible le dosage dans les milieux fortement colorés ou troubles.

L'inconvénient commun à toutes ces méthodes, c'est que la solution aqueuse du DPI est extrêmement instable. Elle se décolore fortement après quelques jours. De plus, son instabilité est beaucoup plus prononcée en milieu acide.

MITSUDA et SHIKANAI (1957) proposent d'utiliser alors une solution dans du butanol de DPI pour éviter ce grave inconvénient. Ces auteurs constatent en effet, qu'une solution de 3 mg % de DPI ne se décolore pas pendant une période de 2 mois de conservation. Elle est parfaitement stable aussi en milieu acide.

La méthode colorimétrique proposée par ces auteurs, en utilisant une telle solution, offre également les avantages de celle de ROBINSON et STOTZ (1945).

Utilisée par la suite, pour le dosage des réductones formées au cours des réactions de brunissement non-enzymatique des sucres avec les acides aminés dans les milieux modèles par KIRIGAYA et al. (1968) et par KATO et al. (1968), et dans la sauce de soja par OKUHARA et SAITO (1970) et par HASHIBA (1973), cette méthode a été adaptée de la façon suivante à nos conditions expérimentales pour le dosage des réductones (ou des réducteurs rapides) dans le moût conventionnel :

3.1.2. Réactifs :

(1) Solution stock de DPI :

Dissoudre 60 mg de DPI sel de sodium dans du *n*-butanol et compléter à 100 ml. Cette solution peut se conserver pendant plusieurs mois au frais et à l'obscurité.

(2) Solution de DPI à 3 mg % :

Diluer la solution stock de DPI de façon à obtenir une solution de 3 mg % avec du *n*-butanol. Cette solution doit être renouvelée tous les deux mois.

(3) Solution de l'acide méta-phosphorique à 6 % :

Dissoudre sans chauffer 60 g de l'acide méta-phosphorique et 1,8 g de EDTA dans 900 ml d'eau distillée. Compléter à un litre et conserver au frais. Refaire une nouvelle solution toutes les semaines.

(4) Solution d'acide méta-phosphorique à 3 % .

(5) Solution tampon acétate à pH 3,6 :

Dissoudre 300 g d'acétate de sodium anhydre dans 700 ml d'eau distillée, ajouter 1000 ml d'acide acétique glacial, ajuster le pH à 3,6.

(6) Solutions standard de l'acide ascorbique :

Dissoudre 100 mg d'acide ascorbique dans la solution de l'acide méta-phosphorique à 3 %. Faire des dilutions avec la solution d'acide méta-phosphorique de façon à avoir 3, 6, 9, 12 mg/l d'acide ascorbique.

3.1.3. Mode opératoire :

- Préparation de l'échantillon :

.../...

Mélanger 25 ml du moût conventionnel fraîchement préparé avec 25 ml de la solution d'acide méta-phosphorique à 6 %.

Filtrer le mélange sur un papier plissé Whatman n° 12 ou équivalent.

Les réductones sont parfaitement stables pendant quelques jours dans une telle solution (OMURA et al. 1974). C'est pourquoi, cette opération doit s'effectuer immédiatement après le prélèvement de l'échantillon.

- Dosage :

Dans un tube de centrifuge de 30 ml, on prépare le mélange suivant :

10 ml de filtrat,

4 ml de tampon acétate,

5 ml de la solution de DPI.

Ce mélange est ensuite énergiquement secoué pendant 5 minutes. Après avoir séparé la couche colorée du butanol par centrifugation à 3000 t/mn, on mesure la densité optique à 530 nm, en prenant comme témoin un tube contenant tous les réactifs sauf la solution DPI qui est remplacée par du *n*-butanol, et traité de la même manière. Le blanc est préparé en remplaçant l'échantillon pour 10 ml de la solution d'acide méta-phosphorique à 3 %.

3.1.4. Courbe d'étalonnage et détermination du coefficient de correspondance

Les solutions standard d'acide ascorbique sont traitées de la



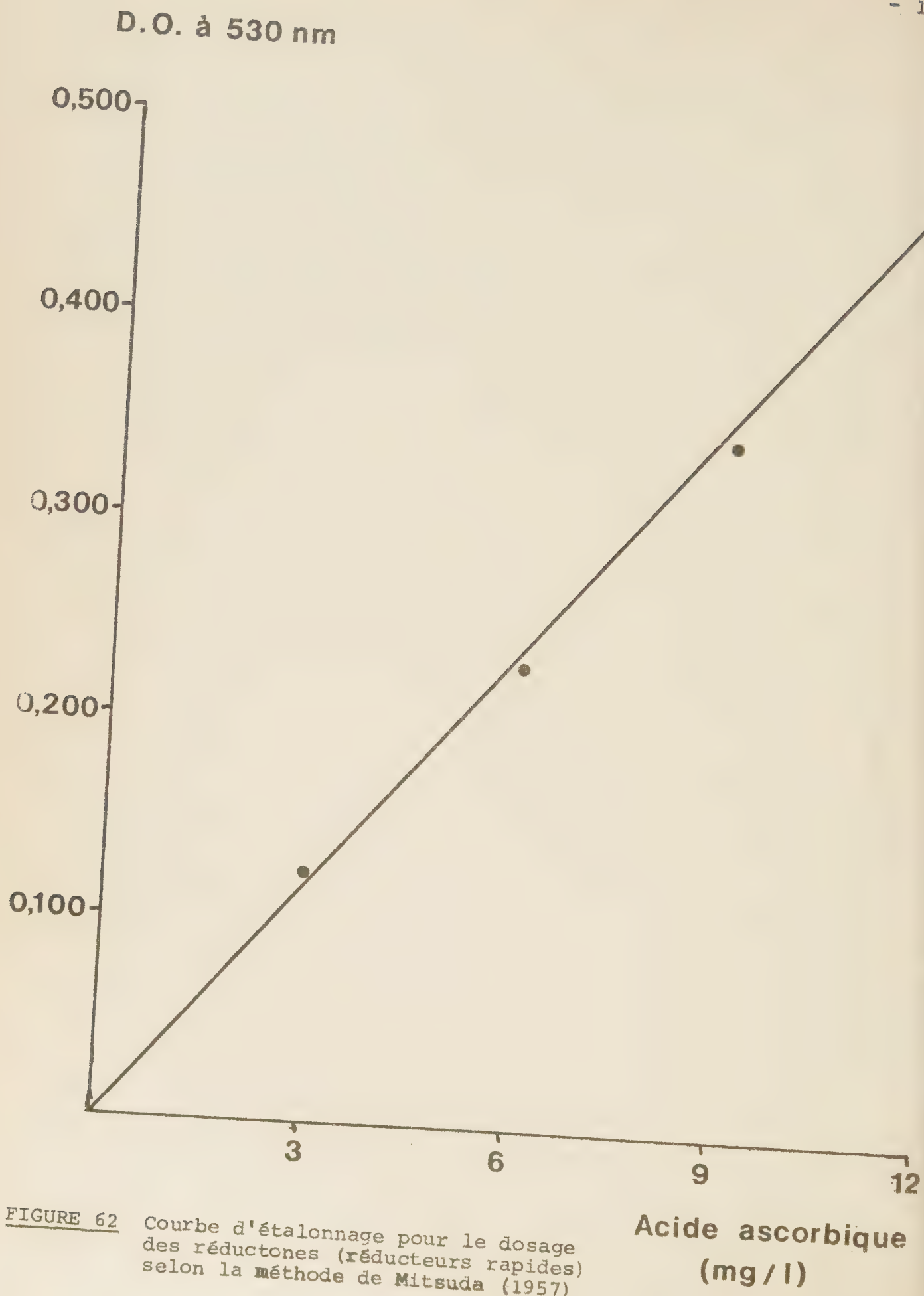


FIGURE 62 Courbe d'étalonnage pour le dosage des réductones (réducteurs rapides) selon la méthode de Mitsuda (1957)

même manière pour établir la courbe d'étalonnage.

A partir des données ainsi obtenues, on peut également calculer la constante d'appareillage (K) d'après la formule :

$$K = \frac{\text{mg acide ascorbique/tube}}{\text{D.O.blanc} - \text{D.O.standard}}$$

On prend la valeur moyenne de K calculée pour différentes solutions standard. Cette valeur est en général constante d'un essai à l'autre ; cependant, il est recommandé de vérifier à l'aide d'une solution standard pour chaque série d'essais.

Le calcul de la teneur en réductones de l'échantillon se fait ensuite selon la formule ci-dessous :

$$\text{Réductones (mg/l)} = \frac{(\text{D.O.Blanc} - \text{D.O.Essai}) K}{\text{ml échantillon/tube}} \times 1000$$

La courbe d'étalonnage que nous avons établie, est présentée dans la figure (62).

La constante (K) dans nos conditions opératoires était : 0,247.

Ainsi les calculs de la concentration des réductones ont été effectués selon la formule :

$$\text{Réductones (mg/l)} = \Delta \text{D.O.} \times 49,4$$

3.1.5. Répétabilité de la méthode :

150 ml de moût conventionnel fraîchement préparé ont été mélangés avec 150 ml d'acide méta-phosphorique à 6 %. Le mélange a été ensuite filtré sur papier.

A partir de 24 dosages effectués sur le filtrat ainsi préparé, nous avons calculé les valeurs suivantes :

Moyenne : 3,45 mg/l

Etendue : 0,40

Ecart type : 0,13

Coefficient de variation : 3,8 %

La méthode donne donc des résultats d'une bonne répétabilité.

5.3.2. Détermination du pouvoir réducteur (réducteurs totaux)

3.2.1. Principe et historique de la méthode

La méthode colorimétrique que nous avons retenue, est basée sur la réaction du ferrocyanure de potassium formé par la réduction du ferricyanure de potassium ajouté dans l'échantillon, avec un sel ferrique en formant le bleu de prusse qui présente un maximum d'absorption à 700 nm.

L'utilisation de ferricyanure de potassium comme agent oxydant a été proposée par HAGEDORN et JENSEN (1923) pour le microdosage des sucres réducteurs dans les milieux biologiques. Dans la méthode titrimétrique mise au point par ces auteurs, on fait réagir le ferricyanure avec les glucides en milieu alcalin à 100°C, puis on détermine l'excès de réactif. Pour cela, on réduit le ferricyanure restant par l'iodure de potassium : il se produit alors un dégagement d'iode que l'on dose par une solution titrée de thiosulfate.

En 1928, FOLIN a élaboré une méthode colorimétrique en utilisant le même réactif pour le dosage du glucose dans le sang. Cet auteur

déterminait le ferrocyanure formé par la réduction de ferricyanure en présence de glucose en milieu alcalin à 100°C, par la formation du bleu de Prusse.

Cette méthode a été ensuite modifiée par MIRSKY et ANSON (1936) pour la détermination des groupements sulfhydrilés des protéines ; CHAPMAN et MCFARLANE (1945) l'ont adaptée pour l'estimation des groupements réducteurs dans le lait en poudre en vue d'étudier l'influence du stockage sur la qualité du produit. Leur méthode consistait à la réduction du ferricyanure à 70°C pendant 20 minutes à pH 5 et à la mesure de l'intensité de la coloration obtenue à 660 nm par l'addition d'un sel ferrique après la précipitation des protéines par l'acide trichloracétique.

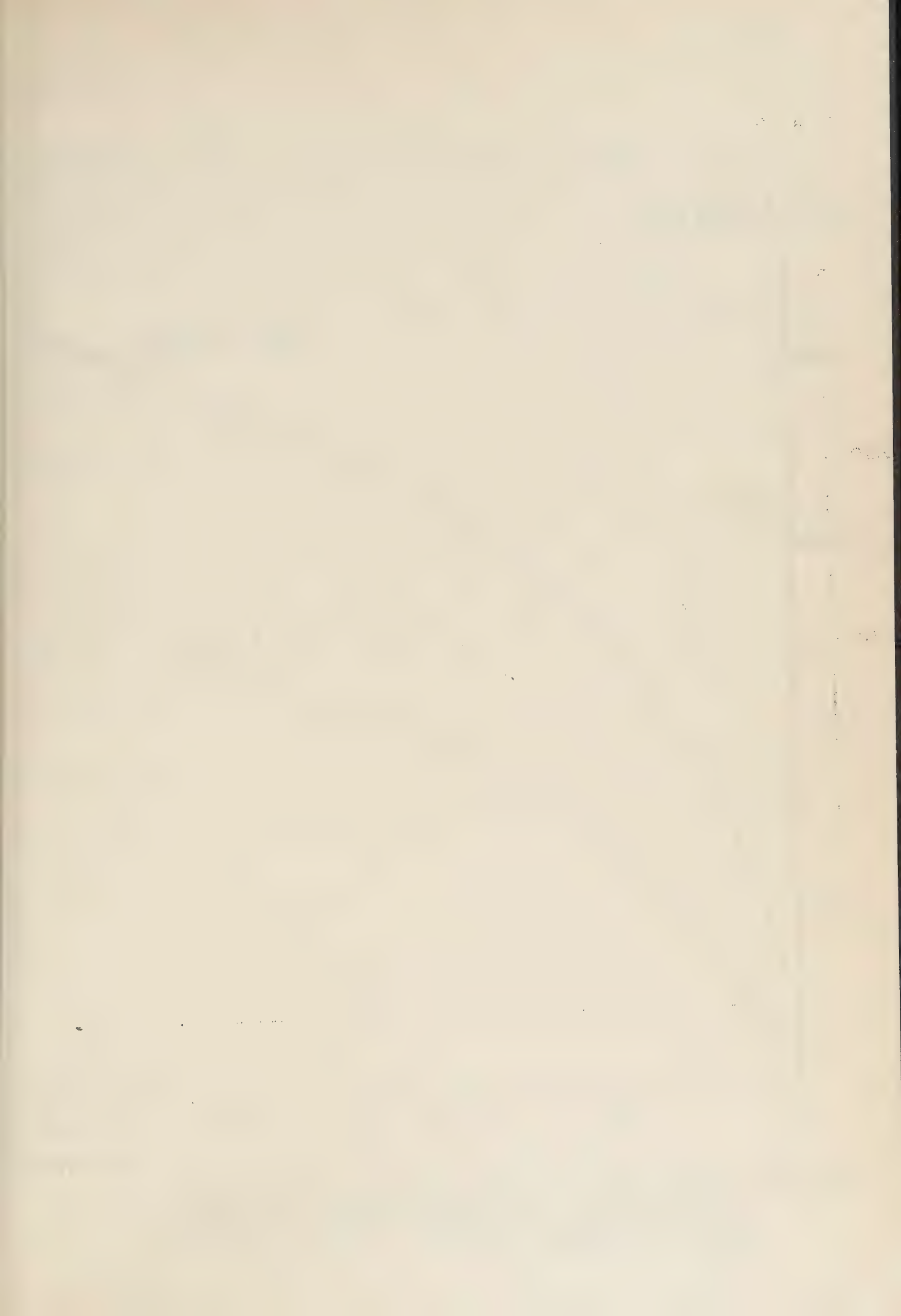
Il est bien évident que dans ces conditions arbitrairement choisies, la réaction du ferricyanure avec les groupements réducteurs est loin d'être complète. Elles permettent, cependant, une différenciation significative entre les échantillons de lait en poudre conservés dans des conditions différentes.

CROWE et al. (1948) se sont heurtés à une difficulté sérieuse lors de la mise en oeuvre de cette méthode. Ils ont constaté une formation précoce du bleu de prusse qui était due à la décomposition du ferricyanure par libération d'ions ferriques pendant la réaction à 70°C.

Ce phénomène dans certains cas, faussait les résultats.

Afin d'éviter cet inconvénient, ces auteurs réexaminent les conditions de la réaction et ils concluent que l'abaissement de la température à une valeur de 50°C et l'augmentation du pH à une valeur de 6,6 permettent d'obtenir des résultats satisfaisants.

ADACHI (1958) dans ses études sur les réactions de Maillard dans les produits laitiers, pour étudier l'évolution des groupements



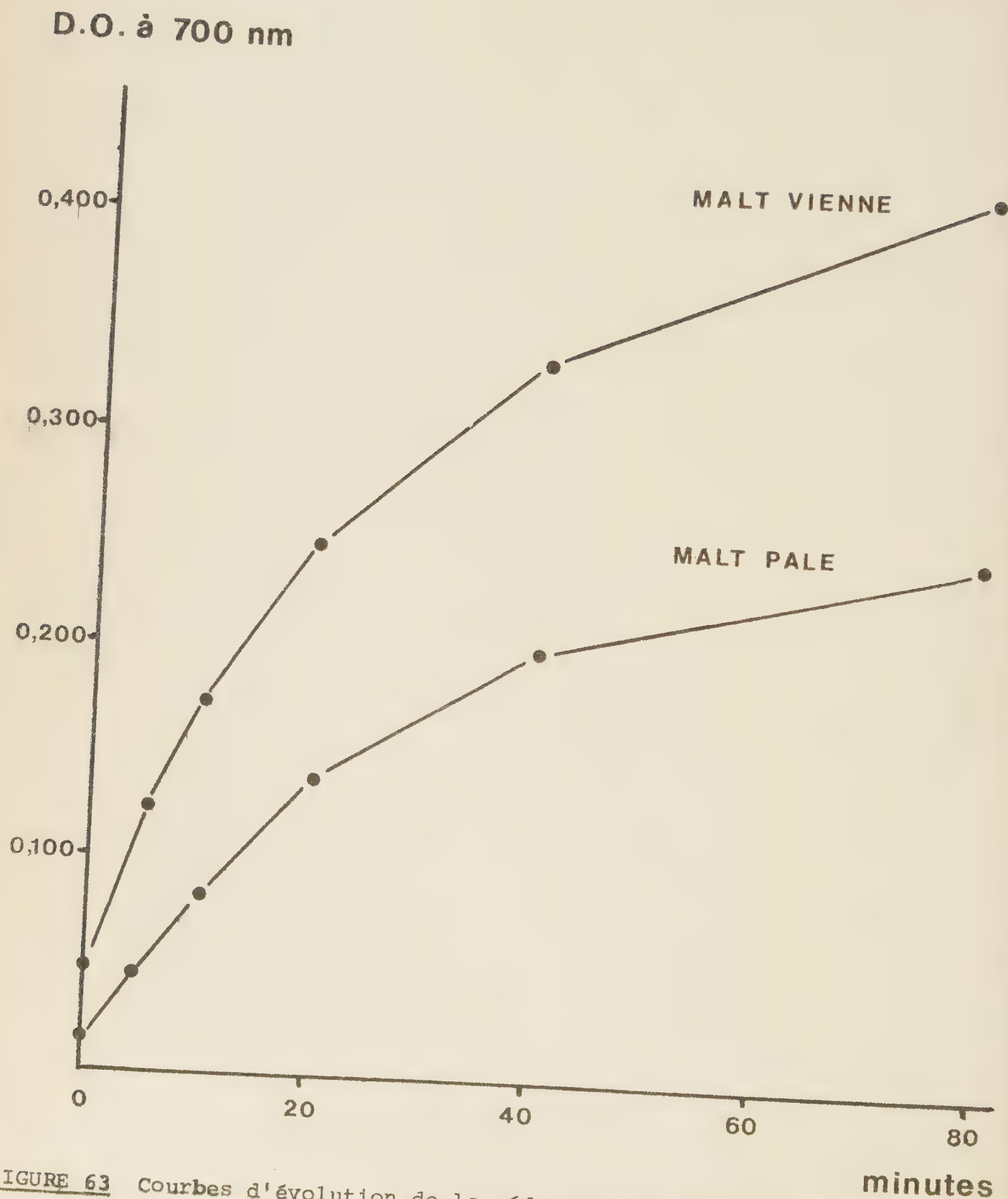


FIGURE 63 Courbes d'évolution de la réduction du ferricyanure de potassium par les composés réducteurs de deux malts en fonction du temps de la réaction selon la méthode de ADACHI (1958)

réducteurs formés au cours du traitement à la chaleur des produits, utilise cette méthode après une dernière modification qui consiste à mesurer la D.O. à 700 nm au lieu de 660 nm, car le bleu de prusse présente un maximum d'absorption à cette longueur d'onde.

Avant d'adopter la méthode ainsi modifiée par ADACHI (1958), il nous a paru intéressant de connaître l'allure de la réduction du ferricyanure par les constituants réducteurs du malt.

La figure (63) donne les courbes typiques obtenues, illustrant cette dynamique pour deux échantillons de malt.

Ces courbes ont été établies à partir des essais effectués sur deux échantillons de moûts conventionnels dilués 50 fois, selon le mode opératoire décrit par ADACHI (1958), sauf que le temps de la réaction en présence du ferricyanure a varié entre 0 et 80 minutes.

On voit que la réduction du ferricyanure n'est pas encore complète au bout de 80 minutes de la réaction à 50°C.

En tenant compte de ces courbes et pour des raisons pratiques nous avons pris à l'instar des auteurs cités ci-dessus, la valeur de D.O. obtenue après 20 minutes de réaction comme le terme du dosage.

3.2.3. Réactifs

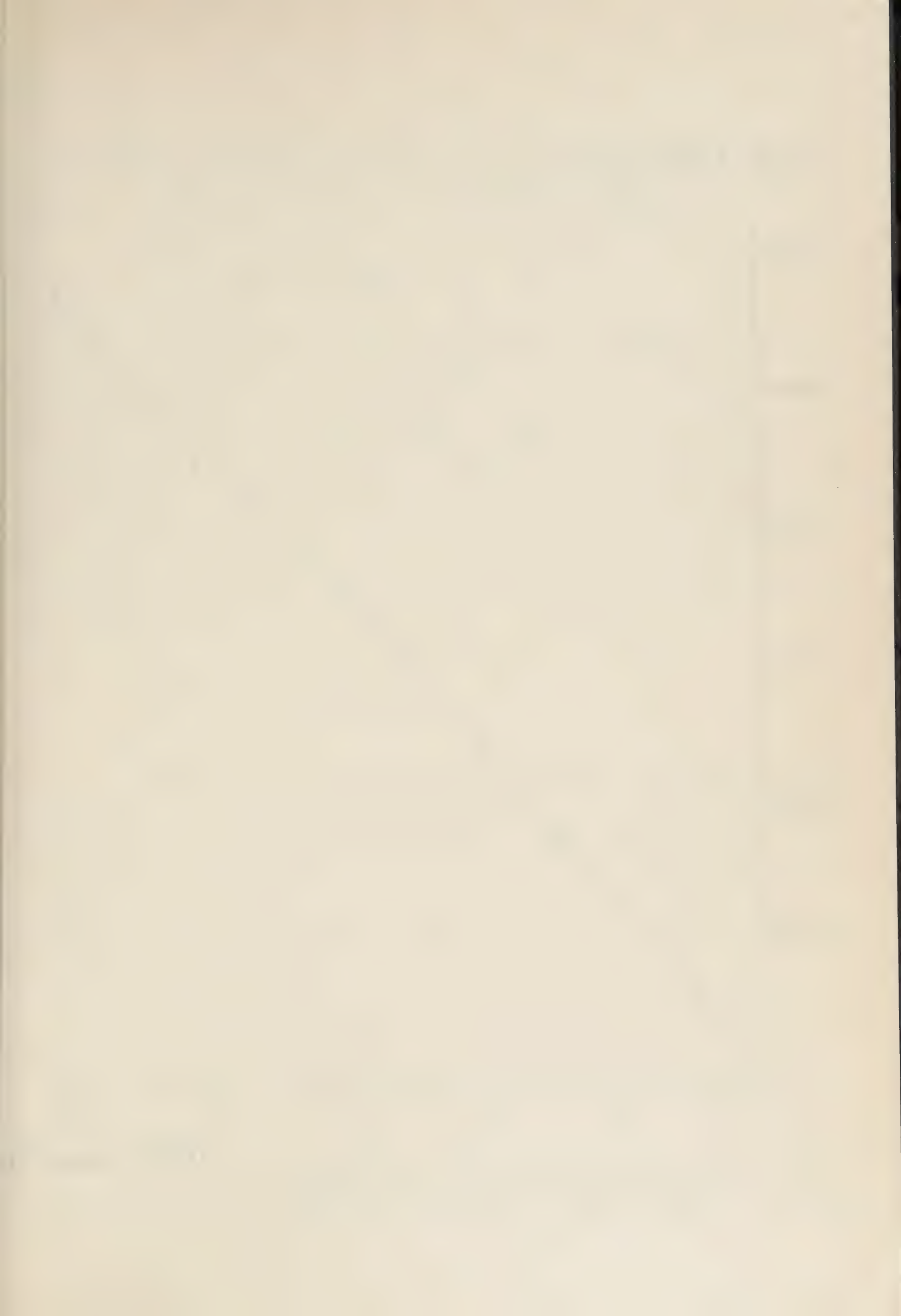
(1) Solution tampon phosphate pH 6,6 :

Mélanger une solution 0,2 M de KH_2PO_4 avec une solution de 0,2 N NaOH et ajuster le pH à 6,6.

(2) Solution d'acide trichloracétique à 10 % ,

(3) Solution de ferricyanure de potassium à 1 % ,

Cette solution se conserve dans un flacon ambré et au frais pendant quinze jours.



D.O. à 700 nm

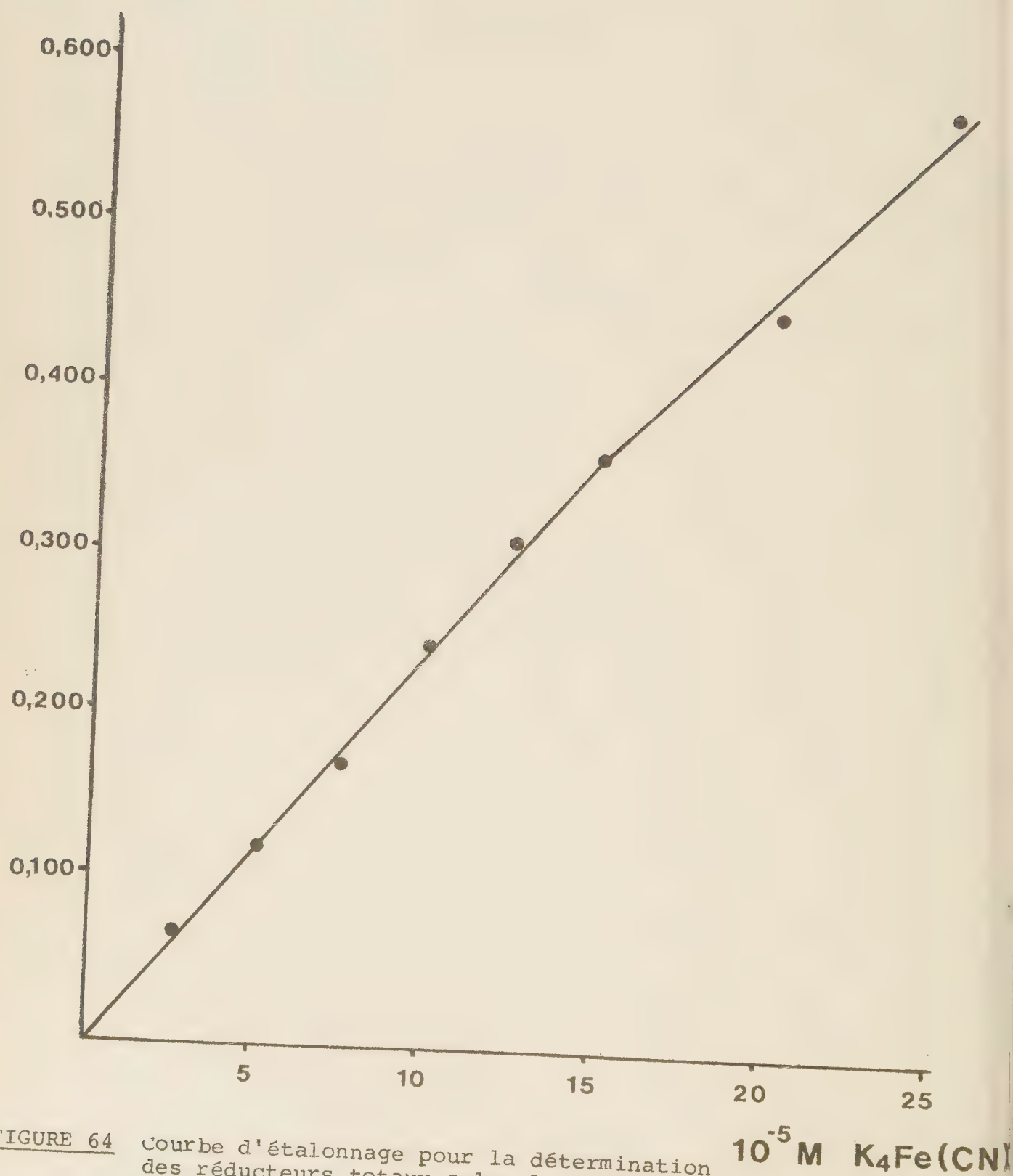


FIGURE 64 Courbe d'étalonnage pour la détermination des réducteurs totaux selon la méthode de ADACHI (1958)

$10^{-5} \text{ M K}_4\text{Fe(CN)}_6$

- (4) Solution de perchlorure de fer ferrique (FeCl_3 , $6 \text{ H}_2\text{O}$) à 0,1 %
Cette solution doit être fraîchement préparée.

3.2.3. Mode opératoire

Dans un tube à essai, introduire 5 ml d'échantillon du moût conventionnel dilué vingt cinq fois et 5 ml de solution tampon phosphate. Mélanger. Le mettre ensuite dans un bain-marie thermostaté à 50°C , laisser vingt minutes exactement. Refroidir sous un courant d'eau froide. Ajouter ensuite 2 ml d'acide trichloracétique et 1 ml de perchlorure de fer. Après 15 minutes, mesurer la D.O. à 700 nm contre l'eau distillée. L'essai à blanc s'effectue en remplaçant l'échantillon par de l'eau distillée.

3.2.4. Courbe d'étalonnage

Etant donné la multiplicité des composés réducteurs mis en jeu, il est préférable d'exprimer les résultats en quantité équivalente de ferrocyanure formé. Pour ce faire, on prépare, sous azote, des solutions contenant de $2,5 \times 10^{-5}$ à 25×10^{-5} M de ferrocyanure de potassium et on procède dans les mêmes conditions, sauf évidemment, que l'on supprime la phase du chauffage à 50°C .

La figure (64) reproduit la courbe d'étalonnage donnant la D.O. en fonction de la concentration en ferrocyanure.

Puisque le bleu de prusse ne se trouve qu'en suspension hautement dispersée dans le milieu, les valeurs trouvées ne suivent pas la loi de Beer-Lambert. Cependant, à l'examen de la figure (64), on peut considérer que jusqu'à une concentration de 15×10^{-5} M de ferrocyanure

la courbe est une droite. Ainsi, en effectuant les dosages sur une dilution de façon à avoir des concentrations inférieures à cette valeur, on peut calculer les résultats selon la formule :

$$\begin{aligned} \text{Réducteurs totaux} &= (\text{D.O. Essai} - \text{D.O. Blanc}) \times 0,416 \times \text{dilution} \\ (\text{m.équiv./l de } K_4Fe(CN)_6) & \end{aligned}$$

3.2.5. Répétabilité de la méthode

Nous avons effectué 36 dosages sur un échantillon de moût conventionnel. Les valeurs suivantes que nous avons calculées, indiquent que la méthode donne des résultats parfaitement reproductibles :

Moyenne : 8,49

Etendue : 0,62

Ecart-type : 0,150

Coefficient de variation : 1,8 %

5.4. INFLUENCES DE DIFFERENTS TYPES DE REDUCTEURS DU MALT DANS LES METHODES DE DOSAGE

Pour pouvoir interpréter les résultats obtenus par ces méthodes, il est indispensable de connaître l'interférence de différentes substances réductrices qu'on rencontre dans le malt, vis-à-vis des réactifs retenus.

A cet effet, les solutions suivantes ont été préparées :

- Solution d'acide ascorbique à 5 mg/l,

- Solution des produits de réactions de Maillard :

18,0 g de glucose et 7,5 g de glycolle ont été dissous

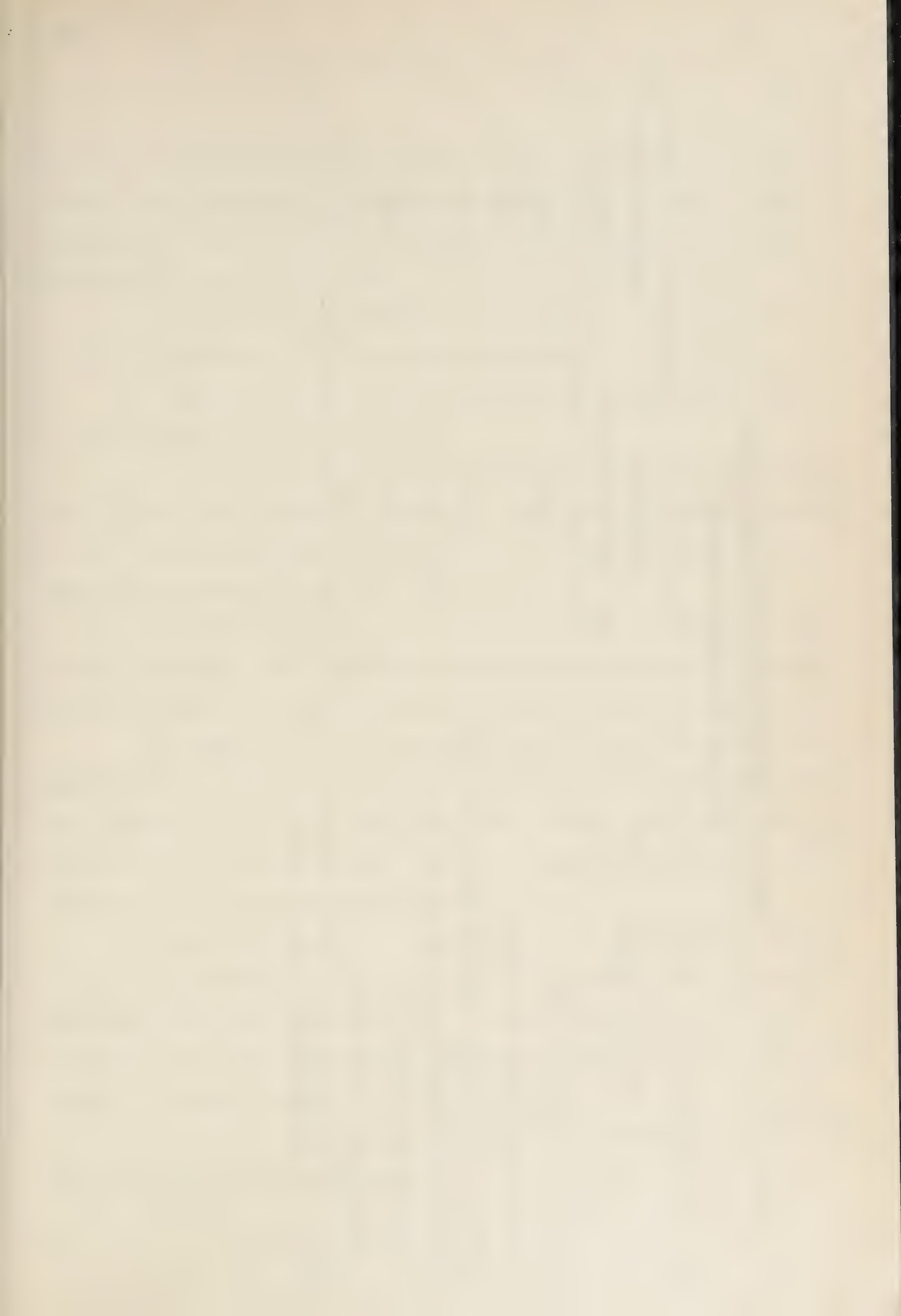


TABLEAU (XV)

Réactivité de différents réducteurs de malt
dans les méthodes de dosages

Substances réductrices *	Réductones (mg/l acide ascorbique)	Réducteurs totaux (m. équiv./l)
Malt (moût conventionnel)		
Solution de l'acide ascorbique	4,8	2,73
Solution des produits de réactions de Maillard	-	0,14
Solution du métabisulfite de sodium	16,0	3,34
Solution de la catéchine	2,0	0,06
Solution de la quercétine	0,9	1,72
	0,8	3,11

* Pour les concentrations, voir le texte.

dans 100 ml de solution tampon phosphate à pH 5,5. Ce mélange a été chauffé à 108°C pendant 12 heures sous reflux. Les dosages ont été effectués sur une dilution au centième. Cette solution diluée avait une coloration de 27 unités EBC.

- Solution de la catéchine à 60 mg/l,
- Solution de la quercétine à 60 mg/l,
- Solution du métabisulfite de sodium à l'équivalent de 2,5 mg/l du SO_2 .

Les résultats obtenus par des dosages effectués sur ces solutions, ainsi que, à titre de comparaison, les valeurs moyennes trouvées par des dosages effectués sur un lot de 57 malts pâles industriels, sont présentés dans le tableau (xv).

En ce qui concerne la méthode de dosage des réductones (réducteurs rapides), les substances qui interviennent, sont principalement les produits des réactions de Maillard et l'anhydride sulfureux.

La catéchine et la quercétine que nous avons choisies pour représenter les composés polyphénoliques du malt et du houblon, réagissent également avec le DPI dans les conditions de réaction retenues. Bien que leur interférence soit faible par rapport aux substances précédentes, elle n'est cependant pas négligeable.

Quant à la méthode de détermination des réducteurs totaux, les valeurs trouvées sont essentiellement influencées par les composés polyphénoliques et les produits des réactions de Maillard. L'acide ascorbique et le SO_2 à des concentrations utilisées ont une contribution minime aux valeurs trouvées par cette méthode.

Signalons d'autre part, que les sucres réducteurs n'interviennent pas du tout dans la méthode.

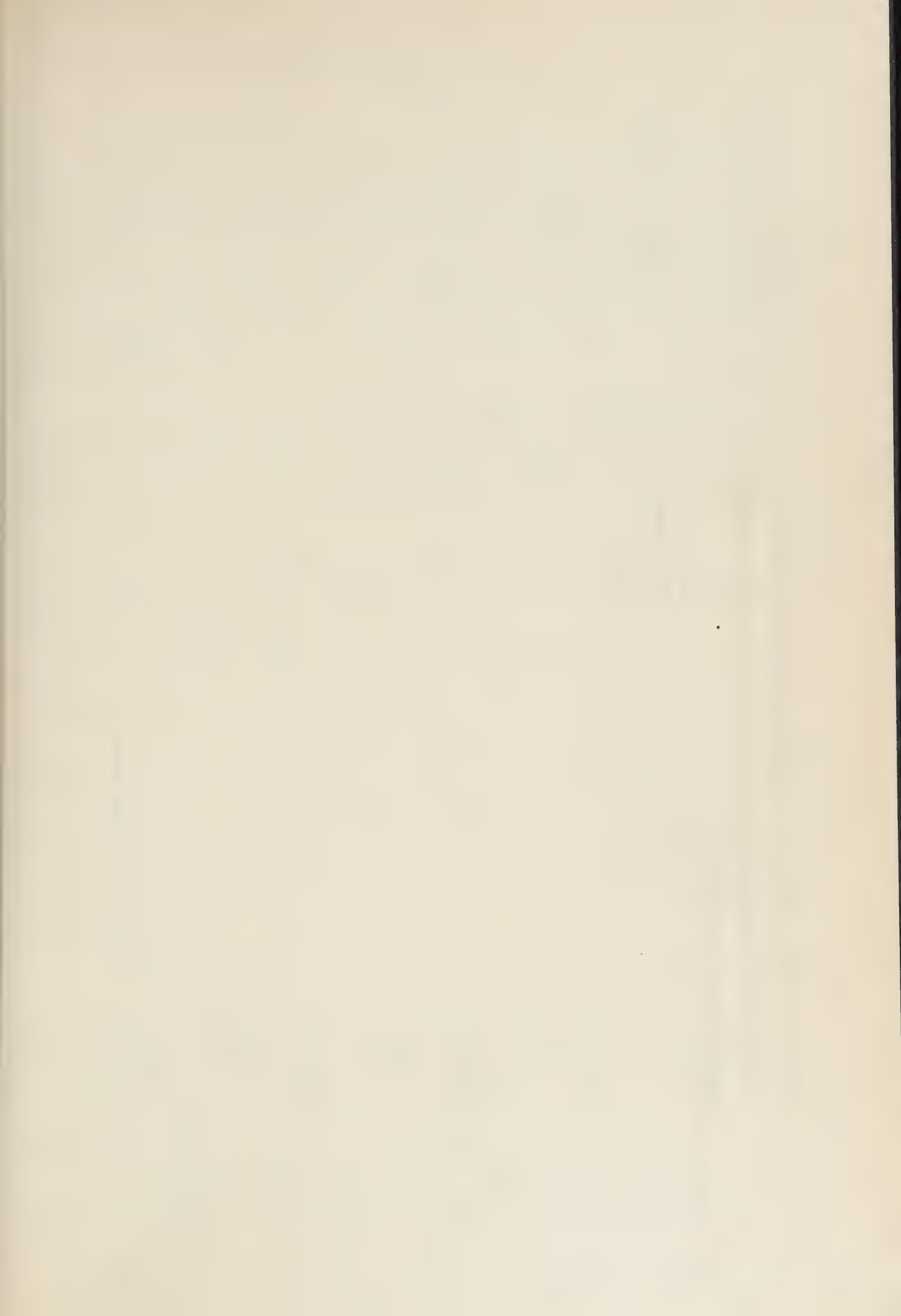


TABLEAU (XVI) Variations des teneurs en réductones, en réducteurs totaux et en polyphénols totaux, déterminées avant et après le traitement des mûts conventionnels par l'AT, dans un lot de 57 malts pâles industriels

	Réductones (mg/100 g M.S.)	Réducteurs totaux (m.équiv./100g M.S.)	Polyphénols totaux (mg/100g M.S.)
Min	2,2	1,79	49,8
Max	6,3	3,33	103,5
Moyenne	4,1	2,64	69,9
Avant AT			
Min	1,0	1,37	9
Max	4,3	2,87	25,8
Moyenne	2,3	2,12	16,9
Après AT			
Min	25	64	35
Max	90	92	35
Moyenne	56	81	24
Après AT x 100			
Avant AT			

Puisque les substances polyphénoliques en tant que réducteurs ont souvent des effets indésirables en brasserie et qu'on souhaite surtout que le malt soit riche en réducteurs non-polyphénoliques, nous avons alors songé, à supprimer leur interférence dans les méthodes de dosage retenues afin de pouvoir mieux juger un malt de ce point de vue.

Pour éliminer les composés polyphénoliques d'un moût conventionnel, nous avons utilisé un agent adsorbant des polyphénols qui porte le nom de *Polyclar AT*, selon le procédé décrit par JERUMANIS (1970).

Ce procédé consiste à faire passer le moût (10 ml) au travers d'une colonne de 1 cm de diamètre où sont préalablement introduits 120 mg de poudre *AT* pour former une couche.

Plusieurs auteurs ont déjà étudié ce produit et ils sont d'accords sur la spécificité de celui-ci vis-à-vis des polyphénols.

D'autre part, JERUMANIS (1970) a bien vérifié le pouvoir de rétention des polyphénols par l'agent *AT*, dans les conditions ainsi déterminées, à l'aide de polyphénols purs : des acides phénoliques, flavonols, catéchines et leucocyanidines et à l'aide des polyphénols isolés des malts et des houblons. Le *Polyclar AT* retenait tous ces polyphénols.

Nous avons alors effectué des dosages des réductones et des réducteurs totaux sur les moûts conventionnels préparés à partir de différents malts pâles industriels, avant et après le traitement avec l'agent *AT*. Les teneurs en polyphénols de ces moûts ont été également déterminées selon la méthode de JERUMANIS et DE CLERCK.

Le tableau (XVI) où nous avons résumé les résultats obtenus, révèle des variations très significatives des grandeurs mesurées avant

et après le traitement par l'AT des moûts dans ce lot de 57 malts pâles industriels de différentes provenances.

Les valeurs trouvées par la méthode de JERUMANIS - DE CLERCK après le traitement par l'AT constituent en moyenne 24 % des valeurs initiales. Cela est dû, d'une part, à une petite quantité de polyphénols non retenus par l'AT (CHAPON, 1971) et d'autre part, aux substances interférentes dans le dosage telles que : les colorants des malts, les mélanoidines, les réductones, les composés sulphydrilés, c'est-à-dire aux réducteurs du malt (JERUMANIS, 1970).

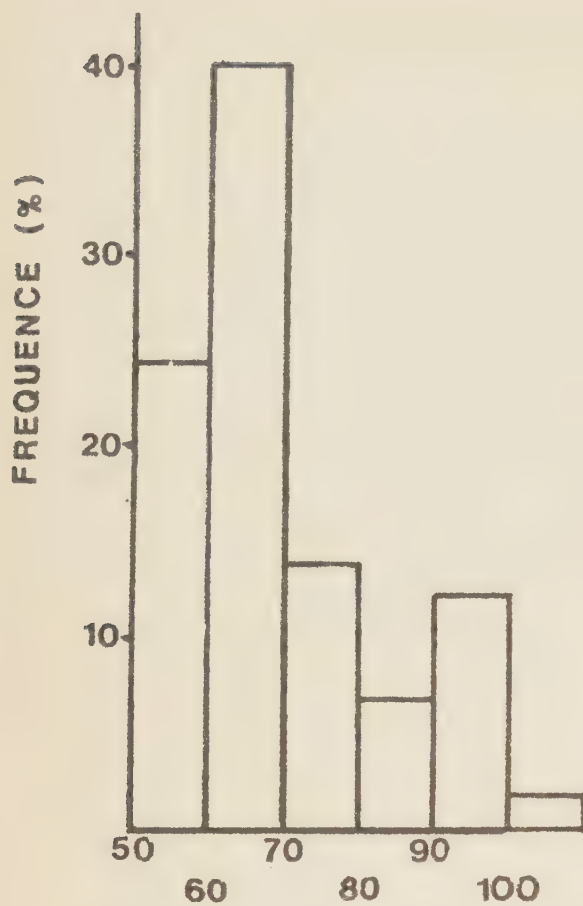
Par contre, en ce qui concerne les réducteurs totaux, nous remarquons que la majorité des substances réductrices du malt dosées selon la méthode ADACHI, sont de nature non-polyphénolique. Car, on trouve en moyenne 81 % de la valeur initiale dans un moût après le passage sur une colonne de AT. Bien que les tests effectués sur des solutions de polyphénols purs (voir tableau XV) nous aient montré la forte réactivité de ces composés vis-à-vis du réactif retenu, leur élimination (du moins la grande partie) ne modifie pas notablement les résultats.

Ces observations infirment celles de CHAPON et LOUIS (1974) qui ont considéré les composés polyphénoliques comme les réducteurs essentiels apportés aux moûts par les malts pâles à la lumière des résultats de détermination du pouvoir réducteur selon la méthode mise au point par les mêmes auteurs.

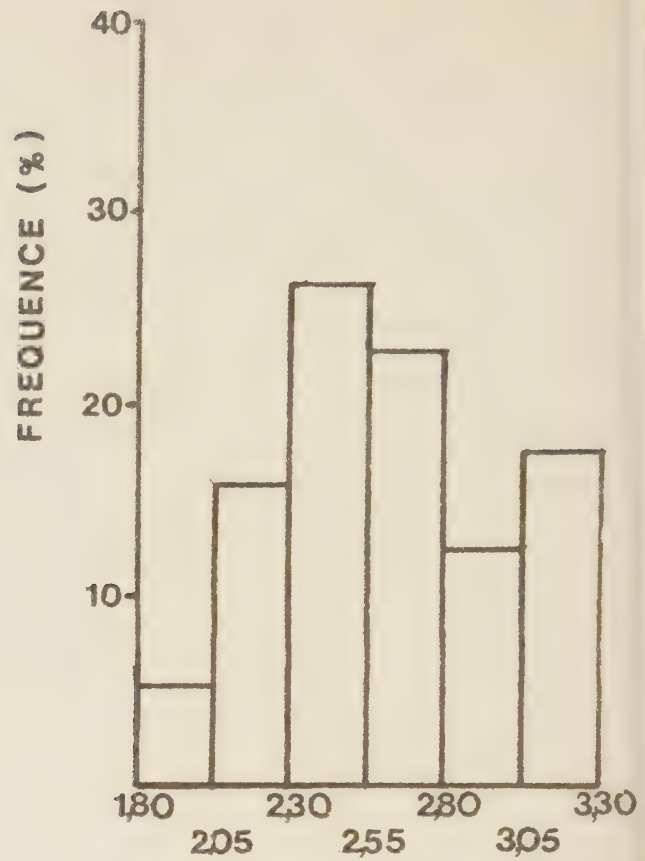
Nous avons alors cherché la corrélation existant entre la méthode de CHAPON-LOUIS et celle de ADACHI.

Pour 23 couples de déterminations, nous avons trouvé un coefficient de corrélation linéaire de $r = + 0,652^{xxx}$, très hautement significatif.

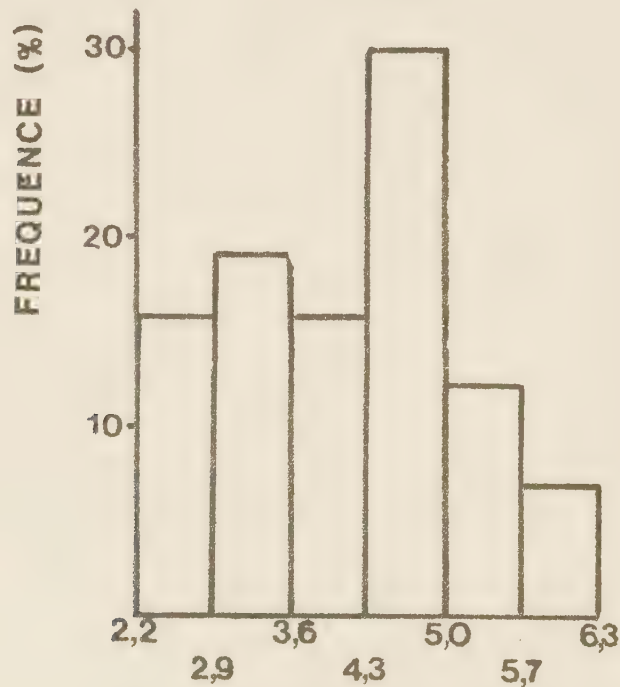




POLYPHENOLS TOTAUX "Avant AT"
(mg / 100g MS)



REDUCTEURS TOTAUX "Avant AT"
(meq. / 100g MS)



REDUCTONES "Avant AT"
(mg / 100g MS)

FIGURE 65 Distribution des fréquences des teneurs en polyphénols totaux, réducteurs totaux et réductones dans une population de 57 malts pâles industriels, avant le traitement des mûts conventionnels par l'AT.

Une autre explication peut être donnée à ce phénomène dans le sens que les substances polyphénoliques non retenues par l'AT pourraient avoir une réactivité, vis-à-vis du ferricyanure, beaucoup plus forte que les substances adsorbées. Cette différence de réactivité entre ces composés qui ne serait pas décelable dans la méthode de CHAPON-LOUIS, pourrait aboutir à un tel résultat.

Ce point exige des travaux complémentaires.

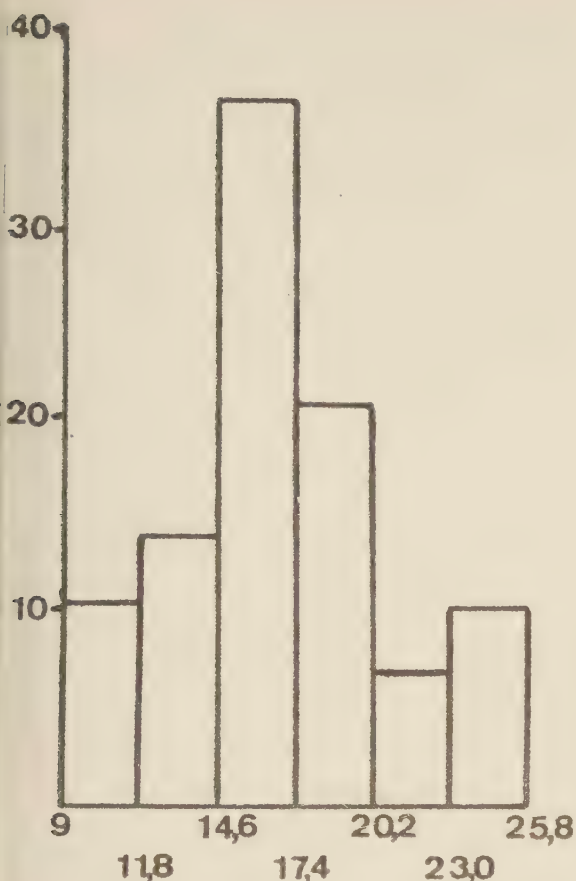
Quant aux teneurs en réductones des malts, après le traitement par l'AT, on constate qu'elles constituent en moyenne 56 % des teneurs trouvées avant le traitement. Cependant, ce rapport varie dans cette population de malts dans de très larges limites, montrant ainsi la différence de la composition en polyphénols sur le plan qualitatif entre les malts étudiés. En d'autres termes, l'interférence des composés polyphénoliques dans cette méthode de dosage des réductones, semble dépendre de leur nature.

Poussons maintenant plus avant nos investigations sur les résultats de dosages obtenus dans cette population de malts.

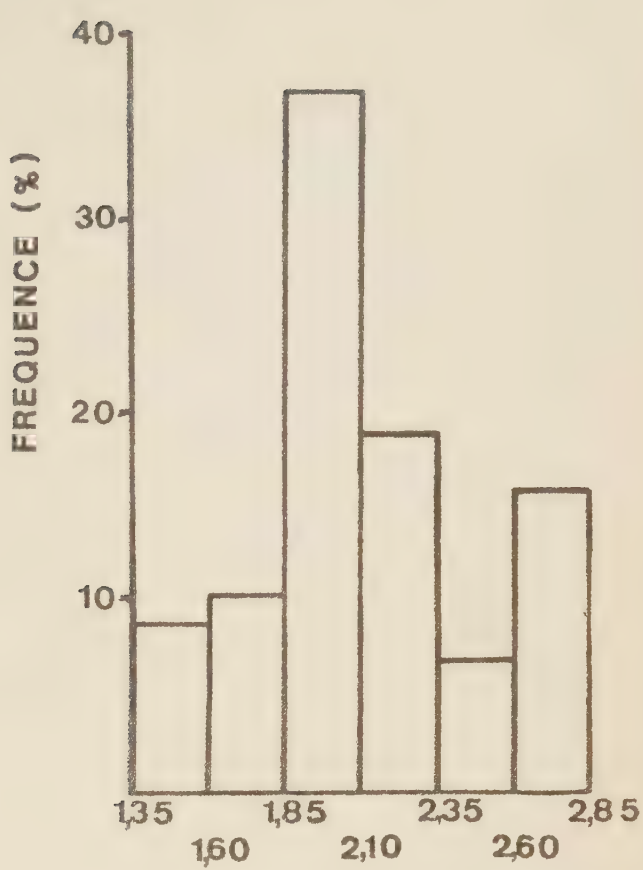
Les histogrammes de la figure (65) illustrent la distribution de fréquences des valeurs trouvées avant le traitement par l'AT des moûts conventionnels.

Les fluctuations que l'on observe à l'examen de ces histogrammes révèlent la multiplicité des facteurs qui interviennent sur les teneurs en substances en cause du malt. On ne constate aucune ressemblance d'allure entre les distributions de ces différentes grandeurs mesurées.

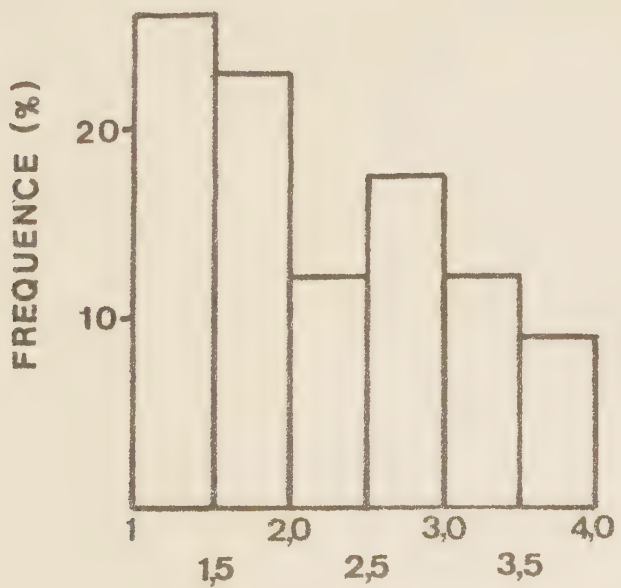
Nous présentons les histogrammes concernant les résultats d'analyse des malts après le traitement par l'AT, dans la figure (66).



POLYPHENOLS "Après AT"
(mg/100 g MS)



REDUCTEURS TOTAUX "Après AT"
(meq./100 g MS)



REDUCTONES "Après AT"
(mg/100 g MS)

FIGURE 66 Distribution des fréquences des teneurs en polyphénols totaux, réducteurs totaux et réductones dans une population de 57 malts pâles industriels avant le traitement des moûts conventionnels par l'AT.

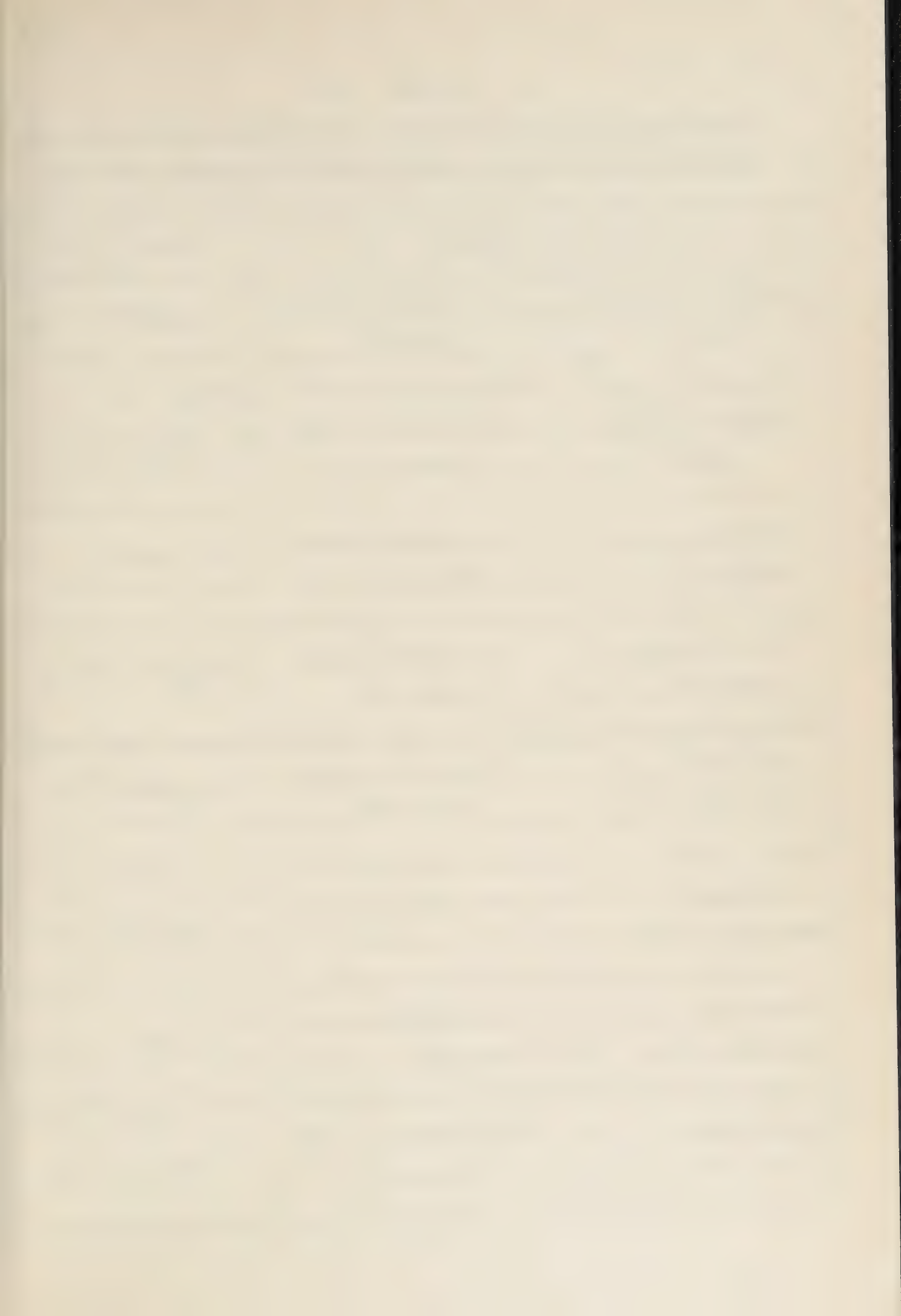


TABLEAU (XVII)

Coefficients de corrélation entre les substances réductrices et les polyphénols du malt avant et après le traitement par l'AT

Couples de paramètres		r	n
Réducteurs totaux	Polyphénols totaux		
"avant AT"	"avant AT"	+ 0,515 ^{xxx}	57
Réducteurs totaux	Polyphénols totaux		
sur AT	"avant AT"	+ 0,798 ^{xxx}	57
Réducteurs totaux	Polyphénols totaux		
adsorbés sur AT	adsorbés sur AT	+ 0,738 ^{xxx}	32
Réducteurs totaux	Polyphénols totaux		
"après AT"	"après AT"	+ 0,302	32
Réductones	Polyphénols totaux		
"avant AT"	"avant AT"	+ 0,797 ^{xxx}	57
Réductones	Polyphénols totaux		
"adsorbés sur AT"	"avant AT"	+ 0,513 ^{xxx}	57
Réductones	Polyphénols totaux		
"adsorbés sur AT"	"adsorbés sur AT"	+ 0,477 ^{xx}	32
Réductones	Polyphénols totaux		
"après AT"	"après AT"	+ 0,217	32

La distribution des teneurs en réductones se distingue de celle des polyphénols et des réducteurs totaux. Les histogrammes de ces deux paramètres présentent une allure très semblable. Cela peut être dû au fait que les substances qui ne sont pas retenues par l'AT et qui réagissent dans la méthode de JERUMANIS-DE CLERCK sont de même nature que celles dosées par la méthode de ADACHI.

Cependant, pour pouvoir tirer des conclusions valables à partir de ces résultats, il nous est indispensable de calculer les corrélations existant entre ces différentes variables étudiées (Tableau (XVII))

La figure (67) illustre la corrélation statistique entre les réducteurs totaux et les polyphénols totaux avant le traitement par l'AT : pour ce lot de 57 échantillons de malt, il existe une corrélation significative au seuil de 99,9 % ($r = + 0,515^{xxx}$).

La corrélation entre les teneurs en réducteurs totaux adsorbés sur l'AT (Δ_{RT}) et les teneurs en polyphénols totaux avant le traitement par l'AT, ainsi que celle entre les valeurs Δ_{RT} et les teneurs en polyphénols adsorbés (Δ_{PPH}) sont également très hautement significatifs (Fig. 68 , 69). Toutefois, les coefficients "r" trouvés (respectivement : $r = 0,798^{xxx}$; $r = 0,738^{xxx}$) sont nettement supérieurs à celui du couple précédent. D'autre part, la corrélation polyphénols "Après AT " n'est pas du tout significative (Fig.70).

Ces résultats nous révèlent un parallélisme des teneurs en substances retenues par l'AT , déterminées selon les deux méthodes. Cependant, les valeurs trouvées par la méthode de dosage des réducteurs totaux sont surtout liées aux composés réducteurs du moût, non-adsorbés sur l' AT

PPH "avant AT"
(mg / 100g MS)

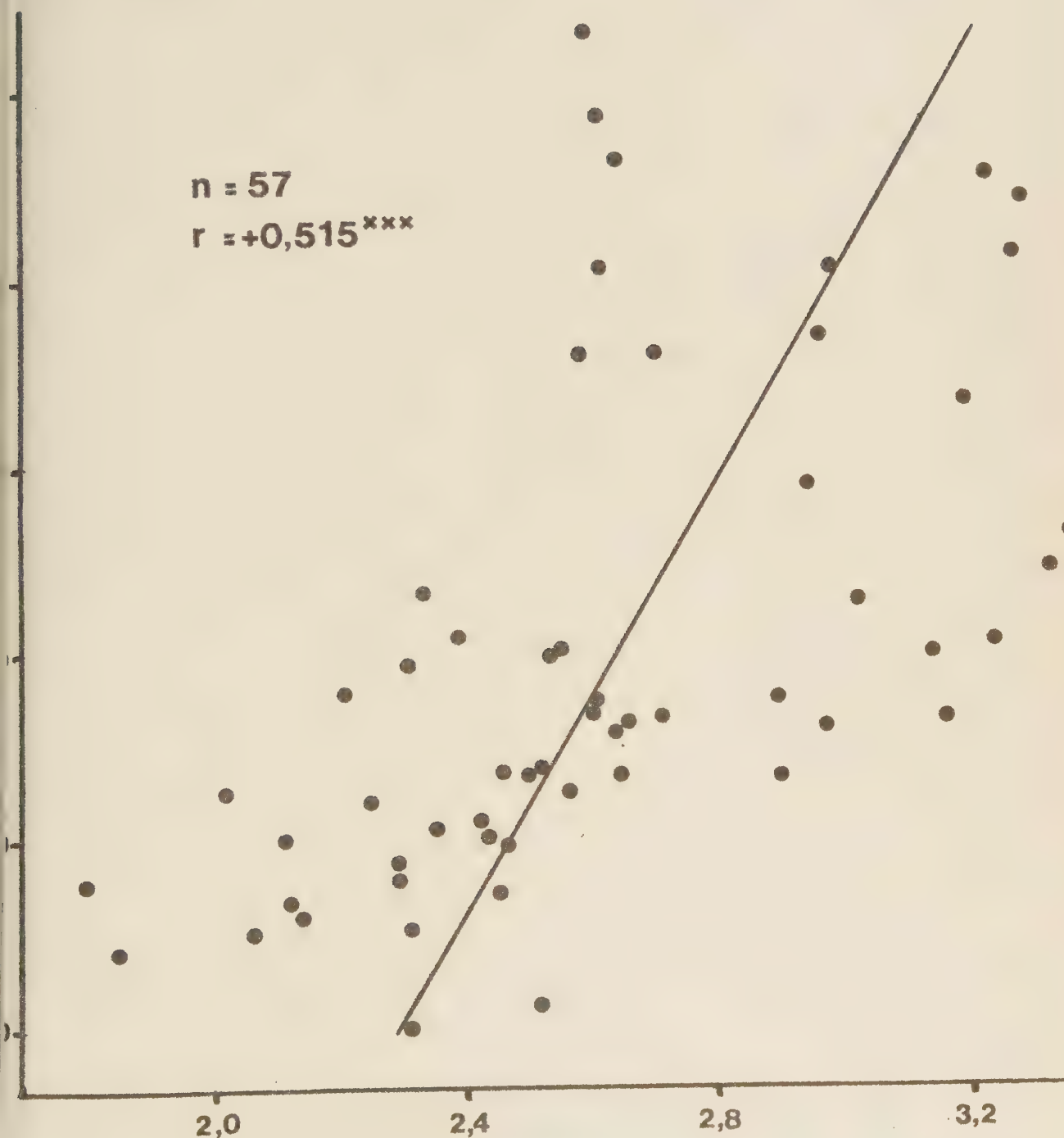


FIGURE 67 Diagramme illustrant la corrélation entre les réducteurs totaux (RT) et les polyphénols totaux (PPH) sur une population de 57 malts pâles industriels, avant le traitement des moûts conventionnels par l'AT

RT "avant AT"
(mequiv./100g MS)

PPH "avant AT"
(mg/100g MS)

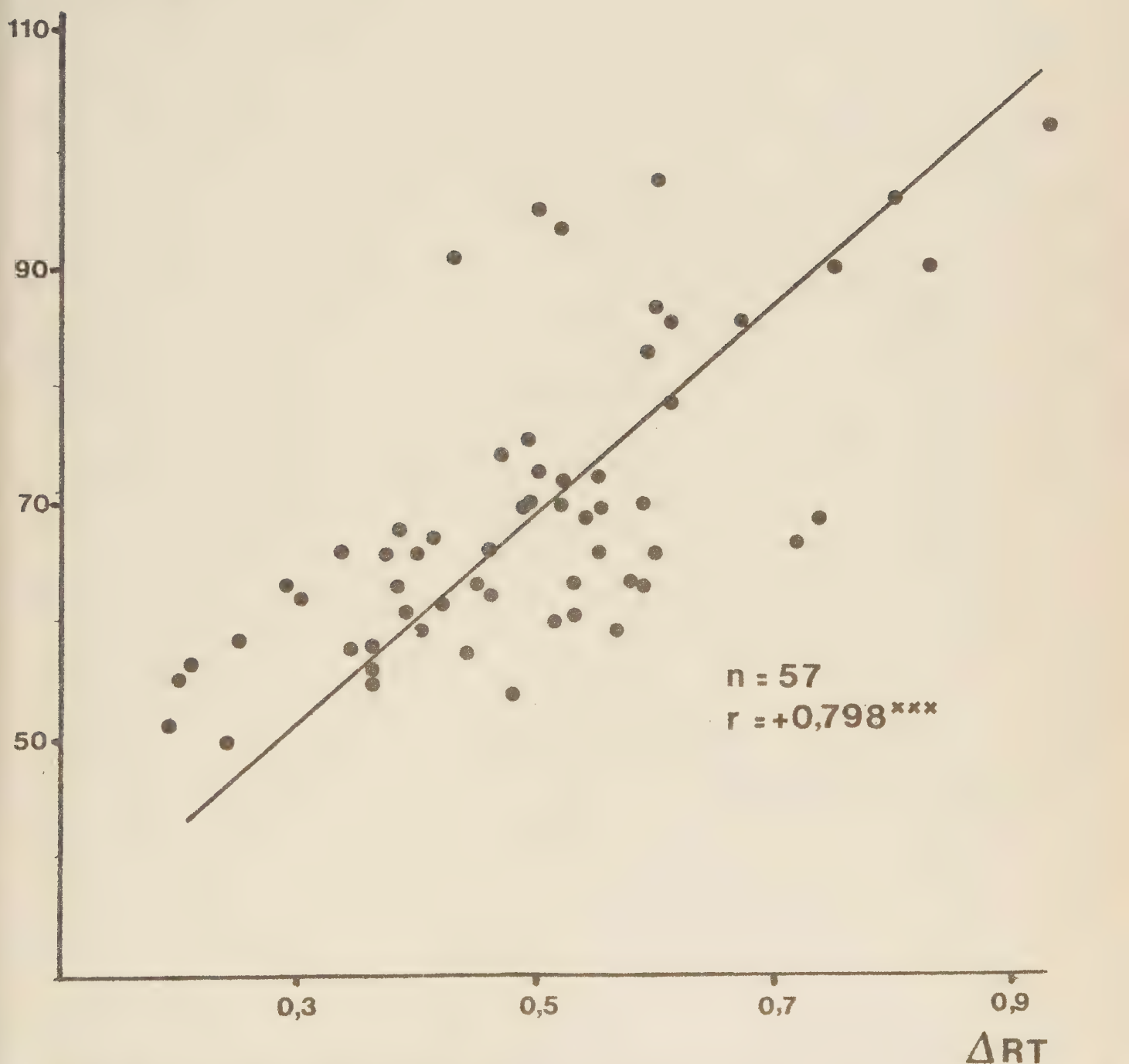


FIGURE 68 Diagramme illustrant la corrélation entre les teneurs en réducteurs totaux adsorbés sur l'AT (ΔRT) et en polyphénols totaux (PPH) avant le traitement par l'AT dans une population de 32 malts pâles industriels

Δ PPH
(mg/100g MS)

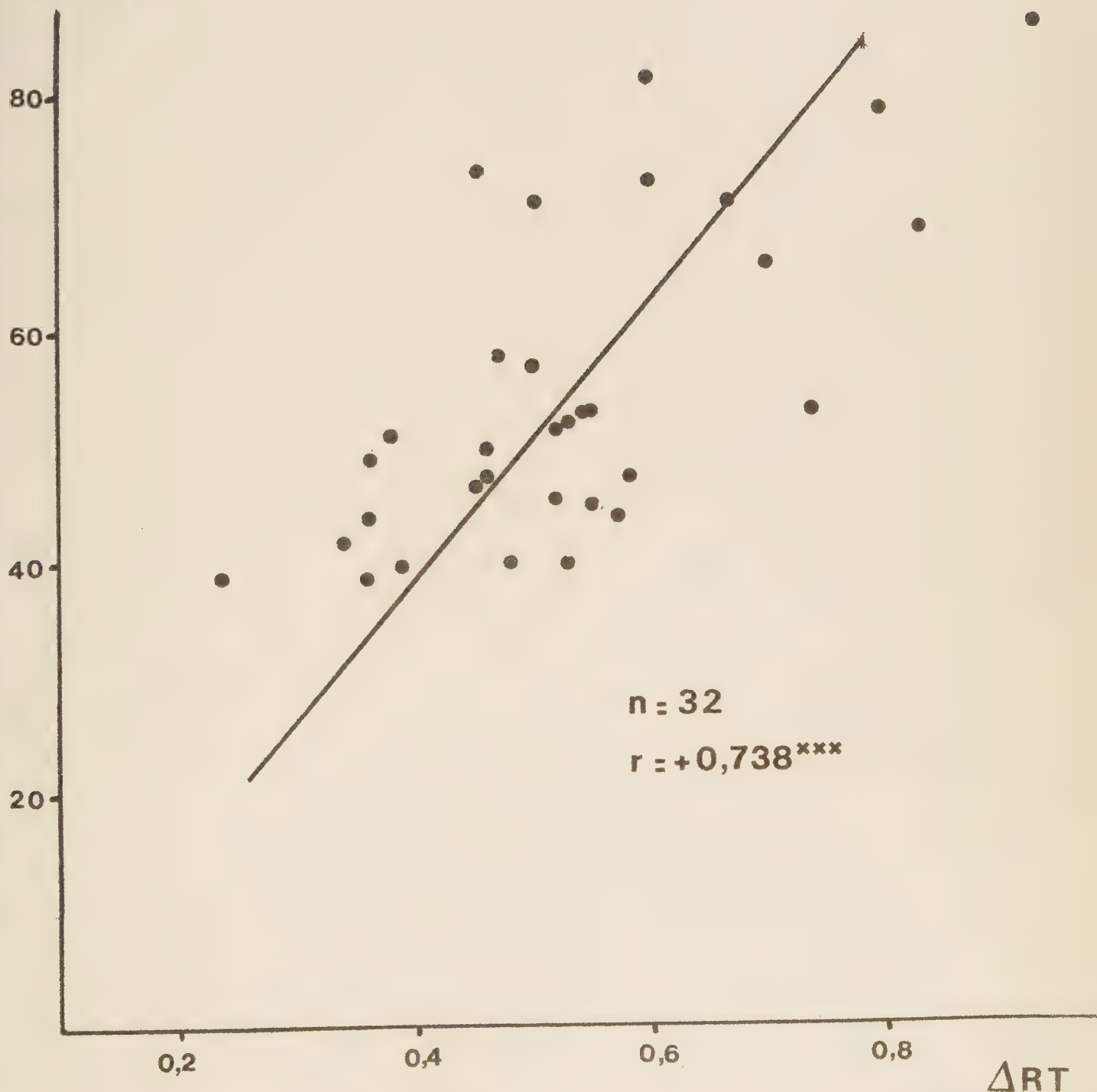


FIGURE 69

Diagramme illustrant la corrélation entre les teneurs en réducteurs totaux adsorbés sur l'AT (Δ RT) et les teneurs en polyphénols totaux adsorbés sur l'AT (Δ PPH) dans une population de 32 malts pâles industriels.

(mequiv/100g M)

PPH "après AT"
(mg / 100g MS)

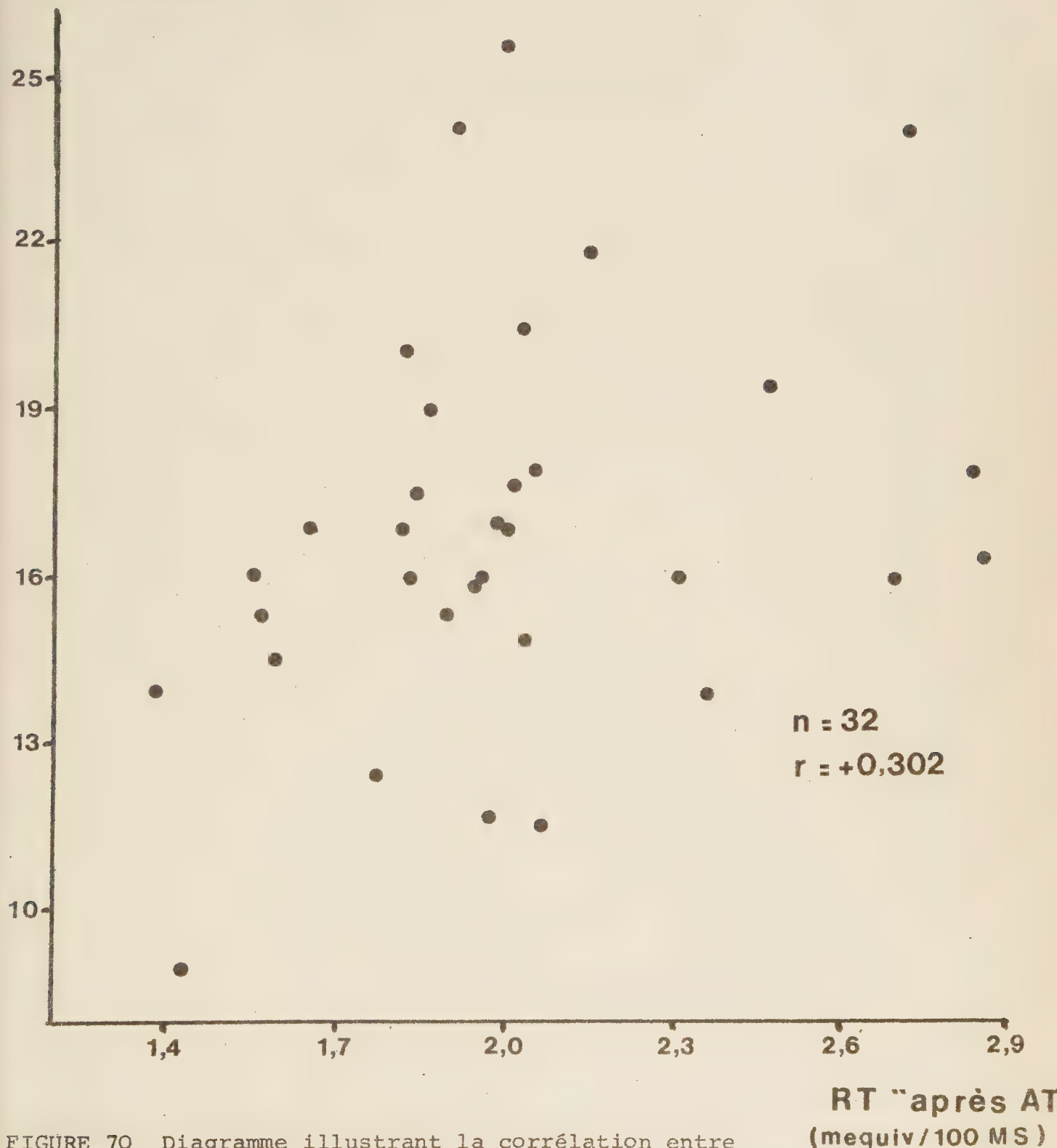


FIGURE 70

Diagramme illustrant la corrélation entre les teneurs en réducteurs totaux (RT) et les teneurs en polyphénols totaux (PPH) dans une population de 32 malts pâles industriels, après le traitement des moûts conventionnels par l'AT.



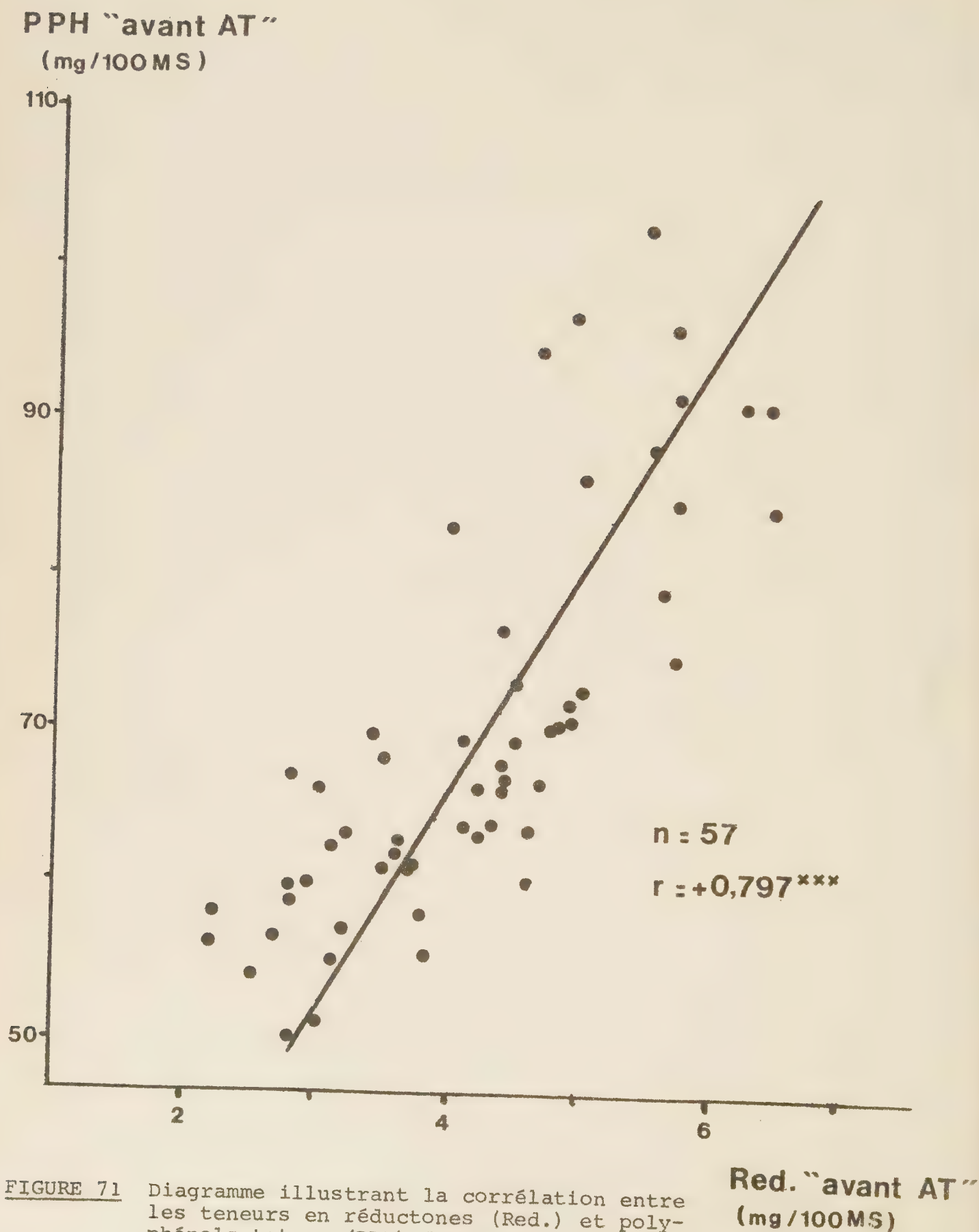


FIGURE 71 Diagramme illustrant la corrélation entre les teneurs en réductones (Red.) et polyphénols totaux (PPH) dans une population de 57 malts pâles industriels, avant le traitement des moûts conventionnels par l'AT.

La corrélation entre les réductones et les polyphénols totaux avant le traitement par l'*AT* présentée dans la figure (71) témoigne de la liaison assez étroite de ces variables dans cette population de 57 malts. Le seuil de signification du coefficient trouvé est de 99,9 %.

Il existe également une corrélation très hautement significative entre les teneurs en polyphénols totaux "Avant *AT*" et les valeurs trouvées par la méthode de MITSUDA, dues aux substances retenues par l'*AT* (Δ Red.) (Fig. 72). D'autre part, on ne trouve aucune liaison entre les valeurs de polyphénols "Après *AT*" et de réductones "Après *AT*" (Fig. 73).

Ces corrélations trouvées nous confirment l'interférence importante des substances polyphénoliques dans le dosage des réductones sur le moût tel quel. Cependant, les résultats obtenus après le passage du moût sur la colonne de *AT* nous donnent des indications plus précises sur ces réducteurs rapides.

Nous avons ensuite cherché les corrélations linéaires existant entre les réducteurs totaux et les réductones. Comme les figures (74) (75) nous le montrent, il existe des corrélations avant et après traitement par l'*AT*.

5. ETUDE STATISTIQUE SUR LES RELATIONS DES REDUCTEURS AVEC D'AUTRES CRITERES ANALYTIQUES DU MALT

A la suite du travail dont les résultats sont décrits précédemment, il nous a paru intéressant de savoir s'il existait des corrélations entre les paramètres relatifs aux substances réductrices, d'une part, et les critères analytiques de désagrégation, la couleur et la

PPH "avant AT"

(mg / 100g M S).

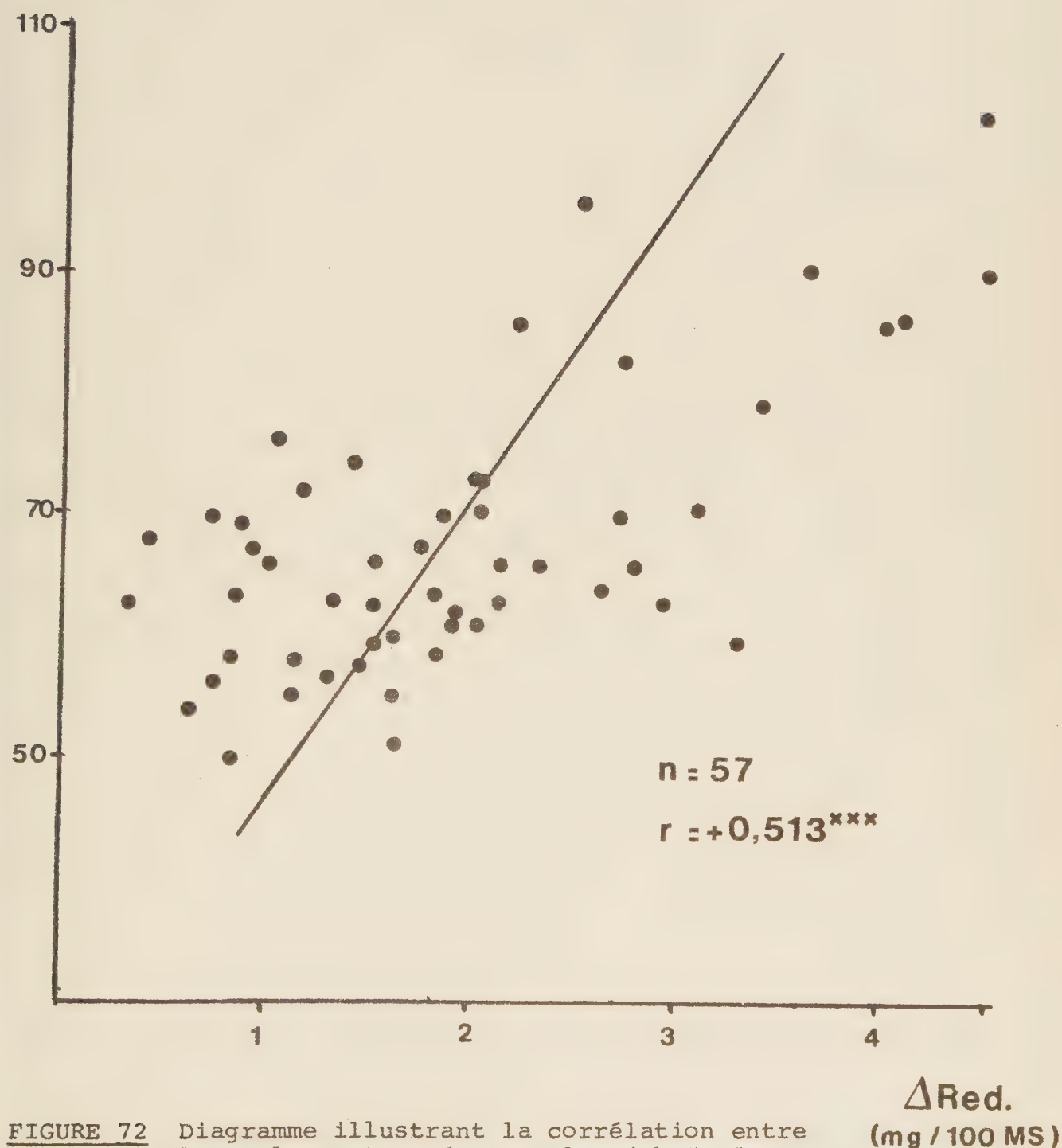


FIGURE 72 Diagramme illustrant la corrélation entre les valeurs trouvées par la méthode de MITSUDA, dues aux substances retenues par l'AT ($\Delta\text{Red.}$) et les teneurs en polyphénols de 57 malts pâles industriels.

PPH "après AT"
(mg/100g MS)

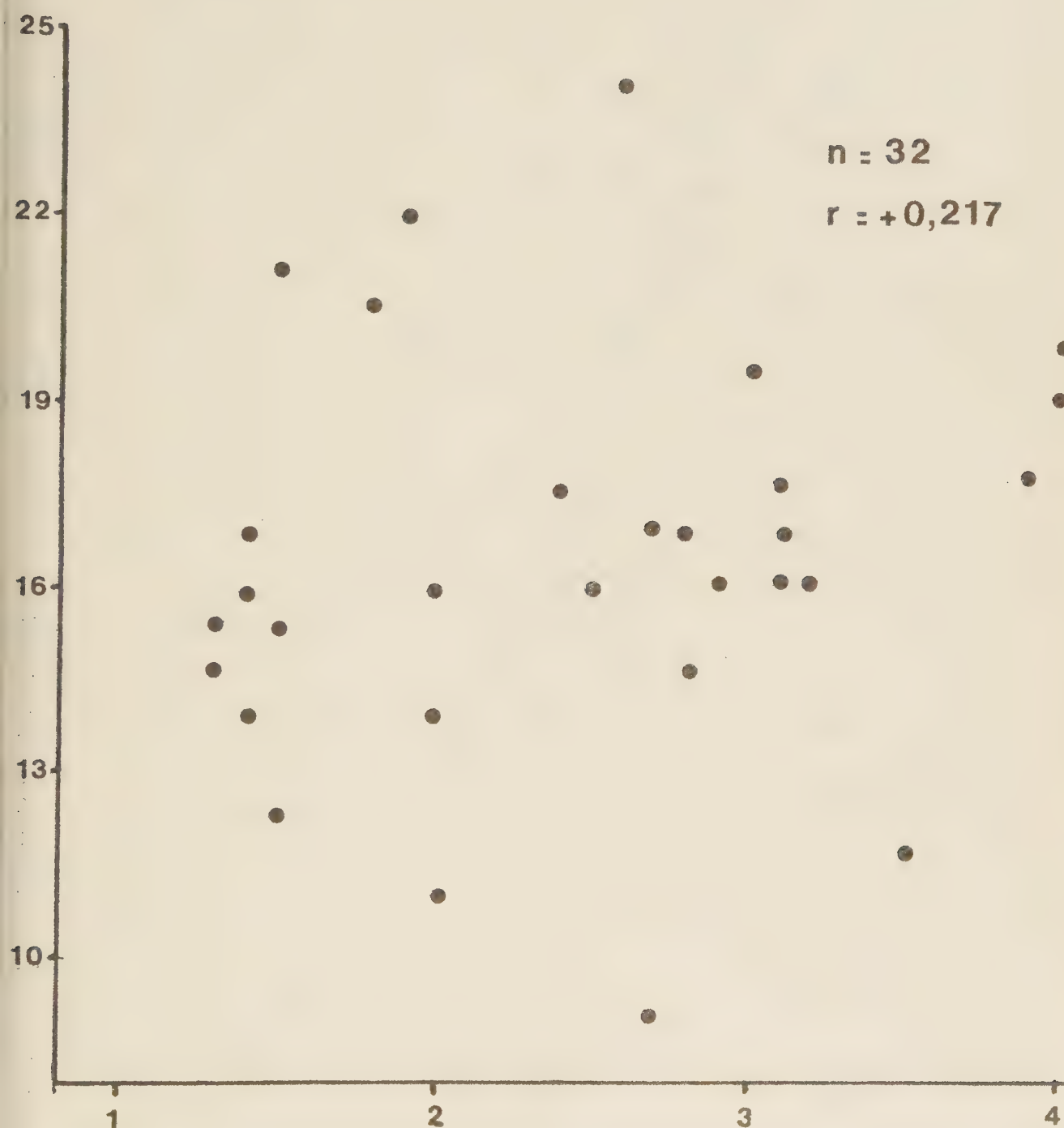


FIGURE 73 Diagramme illustrant la corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux (PPH) et en réductones (Red.) dans une population de 32 malts pâles industriels, après le traitement des moûts conventionnels par l'AT.

Red. "après AT"
(mg/100g MS)

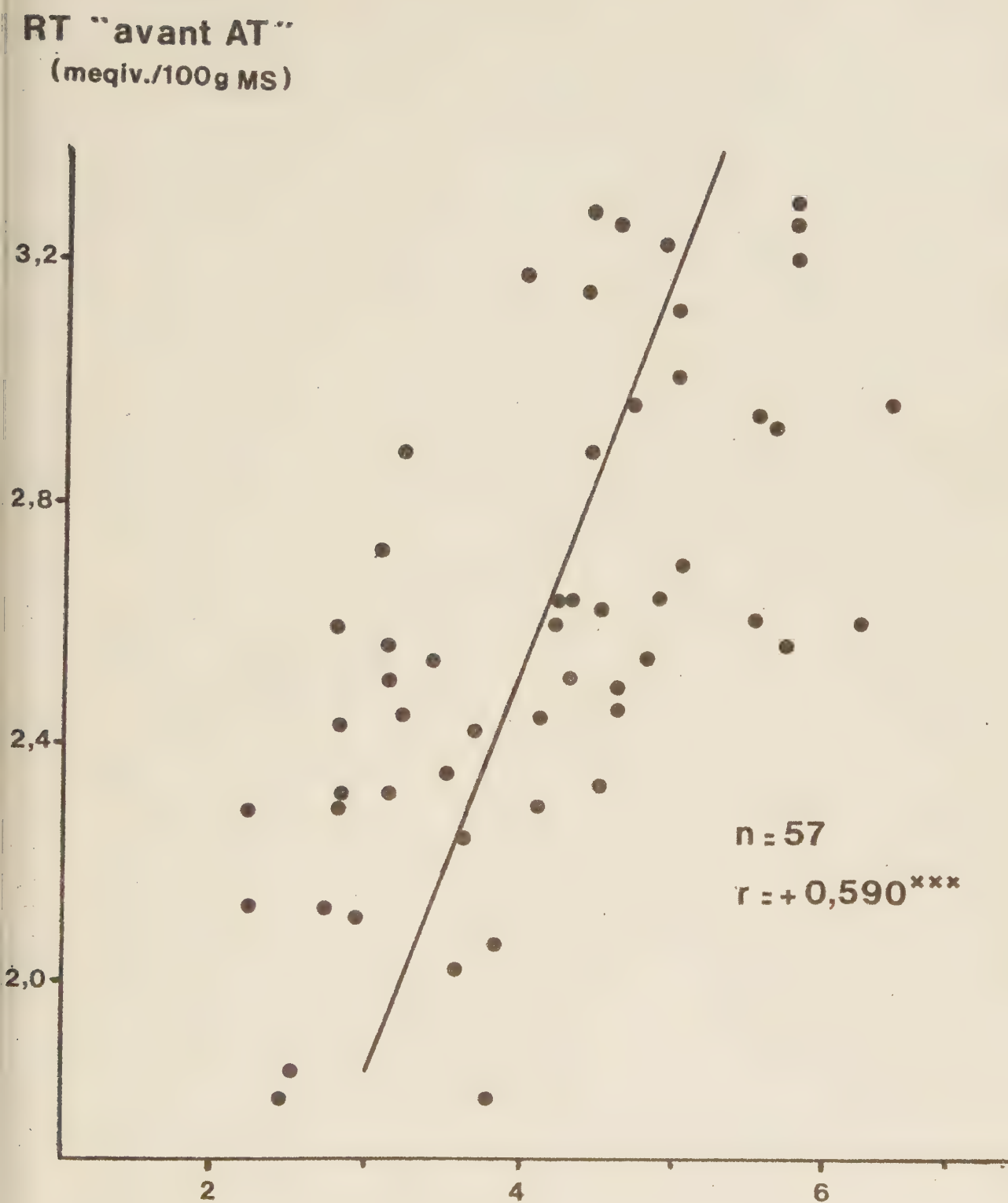


FIGURE 74 Diagramme illustrant la corrélation entre les réducteurs totaux (RT) et les réductones (Red.) dans une population de 57 malts pâles industriels avant le traitement des moûts conventionnels par l'AT.

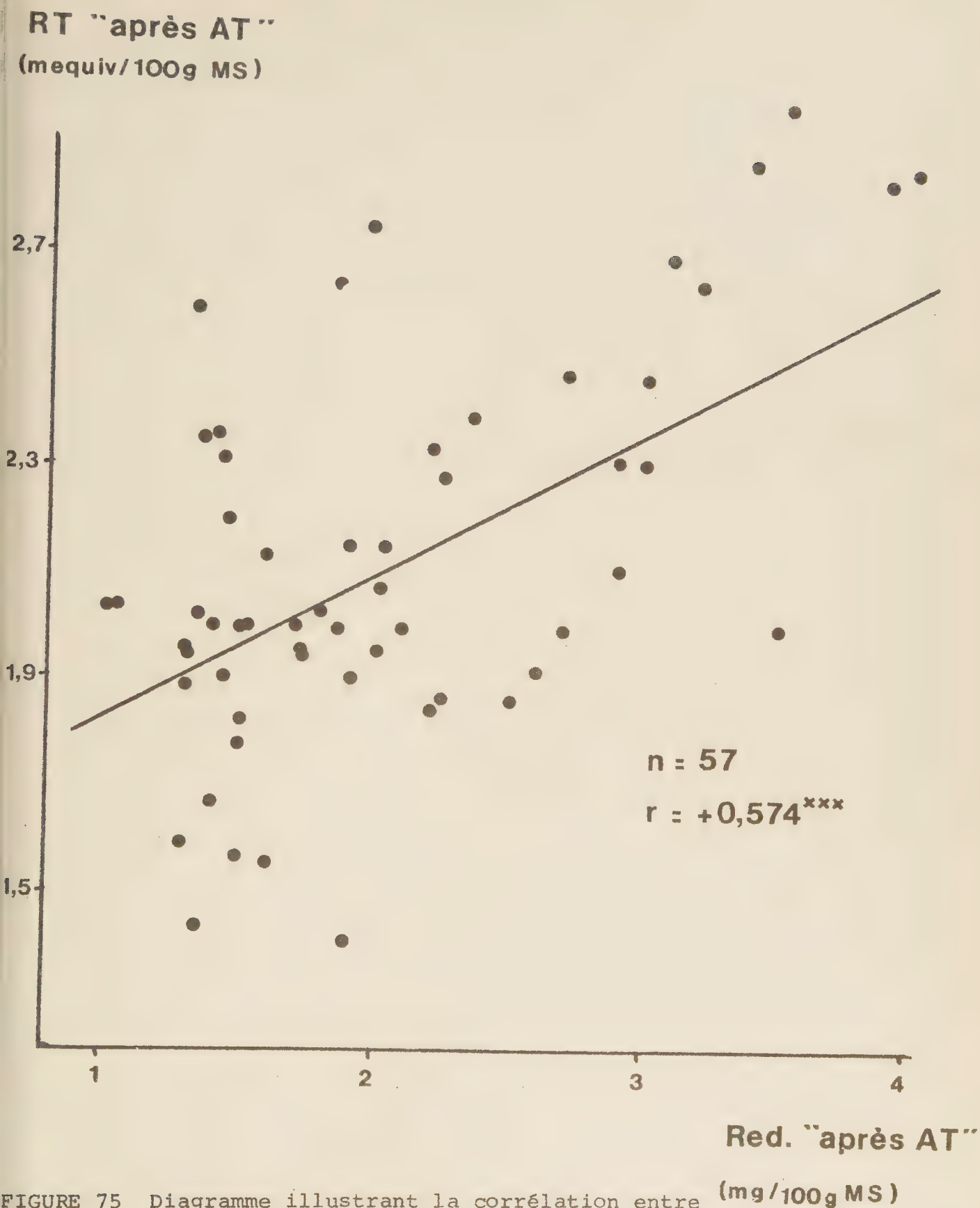


FIGURE 75 Diagramme illustrant la corrélation entre les réducteurs totaux (RT) et les réductions (Red.) dans une population de 57 malts pâles industriels après le traitement des mûts conventionnels par l'AT.



Coefficients de corrélation entre les substances réductrices

et quelques critères analytiques de la désagrégation

de 57 malts pâles industriels

	Polyphénols totaux	Réducteurs totaux "Avant AT"	Réducteurs totaux "Après AT"	Réductones "Avant AT"	Réductones "Après AT"
Protéines solubles	+ 0,494 ^{xxx}	+ 0,650 ^{xxx}	+ 0,653 ^{xxx}	+ 0,549 ^{xxx}	+ 0,455 ^{xxx}
Indice Kolbach	+ 0,709 ^{xxx}	+ 0,721 ^{xxx}	+ 0,625 ^{xxx}	+ 0,752 ^{xxx}	+ 0,483 ^{xxx}
Différence fine grosse mouture	- 0,309 ^{xx}	- 0,349 ^{xx}	- 0,369 ^{xx}	- 0,383 ^{xx}	- 0,405 ^{xx}
Hartong 45°	+ 0,752 ^{xxx}	+ 0,635 ^{xxx}	+ 0,518 ^{xxx}	+ 0,750 ^{xxx}	+ 0,270 ^x
Couleur	- 0,120	+ 0,550 ^{xxx}	+ 0,688 ^{xxx}	+ 0,035	+ 0,063
Surcoloration	+ 0,103	+ 0,607 ^{xxx}	+ 0,701 ^{xxx}	0,118	+ 0,274 ^x

surcoloration du malt, d'autre part.

Les résultats présentés dans le tableau (XVIII) montrent la liaison assez étroite entre les polyphénols totaux et les principaux tests de désagrégation protéique du malt. Nous confirmons ainsi les observations de CHAPON et CHEMARDIN (1964) qui ont déjà montré que la dissolution des tannoïdes au brassage est facilitée par le niveau de désagrégation du malt.

Les coefficients de corrélation trouvés entre les polyphénols totaux, la couleur et la surcoloration ne sont pas du tout significatifs. Cela explique que ces deux derniers critères analytiques du malt sont indépendants de la teneur en polyphénols : ce qui est tout à fait compréhensible.

En ce qui concerne les réducteurs totaux, les résultats obtenus avant et après le traitement par l'AT, nous donnent des indications particulièrement intéressantes. En effet, nous avons trouvé des coefficients de corrélation très hautement significatifs entre les valeurs obtenues par la méthode ADACHI et des critères analytiques de la désagrégation du malt.

Ces résultats sont parfaitement logiques, car la bonne désagrégation du malt, signifie d'une part une meilleure dissolution des substances polyphénoliques et, d'autre part une production importante de glucides simples, d'acides aminés et de peptides actifs dans les réactions de Maillard. D'ailleurs, les corrélations statistiques étroites trouvées entre les réducteurs totaux après le traitement par l'AT et la couleur et la surcoloration, nous confirment la liaison des réducteurs avec les mélanoïdines du malt.

Etant donné l'interférence relativement forte des composés polyphénoliques dans la méthode de dosage des réductones du malt avant l'

traitement par l'AT, les coefficients de corrélation trouvés sont assez proches de ceux trouvés dans le cas des polyphénols totaux.

Cependant, après le traitement du moût par l'AT, on trouve également des corrélations très hautement significatives entre les réducteurs rapides et les protéines solubles et l'indice Kolbach.

La corrélation réductones / différence fine grosse mouture ne se modifie guère avant et après le traitement par l'AT. Par contre, les valeurs des réductones "Après AT" et les valeurs de Hartong 45° se sont moins étroitement corrélées ; cela se comprend bien quand on connaît l'origine de ces substances réductrices.

La corrélation réductones "Après AT" avec la couleur n'est pas du tout significative, tandis qu'avec la surcoloration elle ne l'est qu'au seuil de 95 %. A priori, ces résultats peuvent sembler illogiques cependant, il ne faut pas perdre de vue que le SO_2 qui est également un réducteur rapide, intervient dans la méthode de dosage .

D'après les chiffres donnés par MASCHELEIN et al. (1961) le taux de SO_2 dans des moûts industriels houblonnés varie de 0,6 à 2,5 mg/l et ceci indépendamment du mode de brassage. Ces auteurs précisent que cette fluctuation provient plutôt des teneurs variables en soufre apportées par les matières premières.

Afin d'avoir une idée sur la teneur en SO_2 d'un moût conventionnel, nous avons effectué des dosages selon la méthode colorimétrique EBC (Analytica 1975) sur des moûts conventionnels obtenus à partir de 12 malts pâles de différentes provenances. Les résultats montrent qu'il existe une variation de teneur en SO_2 entre ces moûts, allant de 0,5 à 4,2 mg/l avec une moyenne de 1,9 mg. Cependant, les moûts dont la teneur en SO_2 est supérieure à 2,5 mg/l ne sont qu'au nombre de 3 dans cette population de 12 malts.

Bien que le nombre d'échantillon ne soit pas suffisamment élevé pour pouvoir tirer des conclusions définitives, si l'on tient compte de l'interférence importante du SO_2 dans le dosage des réducteurs rapides selon la méthode de MITSUDA (voir Tableau XV), ces résultats nous montrent que ce composé peut contribuer considérablement à la teneur en réducteurs rapides du malt déterminée selon la méthode en cause.

A la lumière des résultats de corrélation présentés ci-dessus, il s'avère cependant que le SO_2 n'est pas le seul composé réducteur rapide du malt qui subsiste dans le moût conventionnel.

Dans ce présent travail, les dosages des réducteurs du malt ont été effectués sur le moût conventionnel en raison de son intérêt pratique pour le brasseur. Cependant, il est tout de même intéressant de connaître également le taux réel de ces composés présents dans le malt.

A cet effet, nous avons préparé des extraits *sous azote* à partir de deux échantillons de malt pâle quelconque, en empâtant la mouture (25 g) désaérée dans de l'eau (200 ml) désaérée par ébullition puis refroidie sous azote.

Afin de pouvoir tenir compte de la dissolution des composés réducteurs à des températures utilisées pour le brassin conventionnel, les extractions ont été faites à 20, à 45 et à 70°C. La durée de l'extraction était de 60 minutes.

Les résultats obtenus à partir des dosages effectués sur des extraits préparés sous azote ainsi que sur des moûts conventionnels préparés dans des conditions classiques, ont été illustrés par les histogrammes de la figure (76).

REDUCTONES (mg/l)		REDUCTEURS TOTAUX (mequiv./l)		POLYPHENOLS TOTAUX (mg/l)
avant AT	après AT	avant AT	après AT	

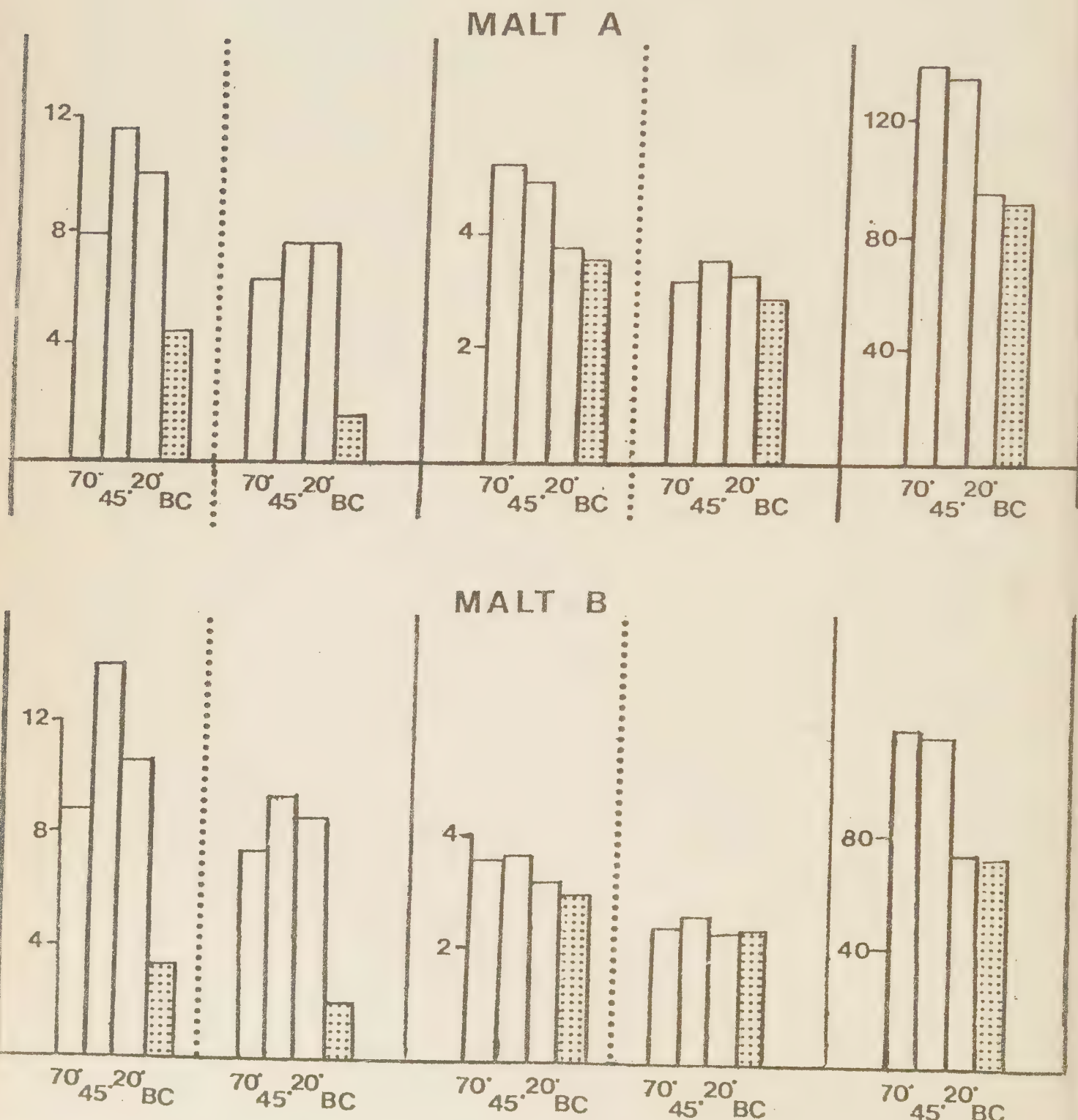


FIGURE 76

Influence de la température d'extraction (sous azote) des substances réductrices du malt, avant et après le traitement par l'AT et la comparaison des valeurs trouvées à partir des extraits préparés sous azote avec celles trouvées à partir des moûts conventionnels.
BC : Brassin conventionnel

On constate que le taux des réducteurs rapides des extraits préparés sous azote est très largement supérieur à celui du moût conventionnel.

Etant donné l'interférence des polyphénols dans la méthode, les dosages effectués sur des extraits non-traités par l'AT révèlent une augmentation des teneurs en réducteurs rapides lorsque la température d'extraction passe de 20 à 45°C. Cependant, à 70°C, bien que le taux de polyphénols ne varie guère, on observe une chute importante dans les teneurs de ces substances.

Cela peut être expliqué par le fait que les phénomènes d'oxydation sont accélérés à des températures élevées et que malgré nos soins d'éliminer l'oxygène dans le milieu, sa présence même en très petite quantité, peut entraîner une destruction d'une partie de ces composés facilement oxydables.

En ce qui concerne les réducteurs totaux, les différences qu'on observe entre les extraits préparés sous azote et le moût conventionnel, en dehors de celles qui sont dues aux composés polyphénoliques, signifient que ces substances ne sont pas beaucoup affectées dans les conditions d'obtention du moût conventionnel.

5.6. CONCLUSIONS

Cette étude sur les réducteurs du malt s'avère d'un grand intérêt pratique pour le malteur et le brasseur, en raison de l'importance primordiale des problèmes d'oxydation en brasserie et leur incidence sur la stabilité colloïdale et la stabilité organoleptique de la bière.

Quant à la composition réelle des substances réductrices du malt, les méthodes analytiques actuelles ne nous permettent pas de tirer des conclusions définitives.

Néanmoins, les résultats obtenus par les deux méthodes décrites dans le présent travail, l'une pour les "réducteurs rapides" (méthode Mitsuda), l'autre pour les "réducteurs totaux" (méthode Adachi), montrent la variabilité de ces grandeurs dans un lot de 57 malts provenant de 17 malteries différentes. De plus, ils mettent bien en évidence les liaisons existant entre les teneurs en réducteurs d'une part, et le niveau de désagrégation, la couleur et la surcoloration du malt d'autre part.

Le traitement du moût conventionnel par l'AT avant les dosages permet en outre de mieux apprécier la richesse en réducteurs non-polyphénoliques du malt. La méthode Adachi nous semble la plus intéressante dans ce cas pour le dosage des réducteurs totaux du malt et du moût car elle est moins influencée par la présence de SO_2 dans le malt et le moût. De tels critères analytiques sont d'une grande utilité pour le brasseur et pour le malteur dans la mise au point des fabrications.

6. REACTIONS DE BRUNISSEMENT NON-ENZYMATIQUE DANS LES MOUTS MODELES AU COURS DU TEST KOLBACH-ZASTROW

6.1. INTRODUCTION

Parmi les opérations de Malterie-Brasserie, la cuisson du moût constitue une étape favorable au déroulement des réactions de brunissement non-enzymatique.

Comme nous l'avons vu dans la première partie de notre exposé, le brunissement du moût pendant cette opération a été attribué aux réactions de Maillard et aux réactions de caramélisation, le rôle des polyphénols étant très réduit (HASHIMOTO et KOIKE, 1971 ; SCRIBAN et DUPONT, 1973).

Quant à la perte en acides aminés ou en glucides du moût qui intervient au cours de la cuisson, les observations de plusieurs chercheurs ne concordent pas.

En ce qui concerne les acides aminés, SANDEGREN et al. (1954) et JONES et PIERCE (1967) signalent une nette diminution de la teneur en acides aminés basiques du moût, tandis que MANDL et al. (1970) et SCRIBAN et DUPONT (1973) n'observent pas de changement notable au cours de la cuisson du moût.

Ainsi, ces derniers auteurs pensent que la réaction principale à la cuisson du moût serait le brunissement des oses catalysés par les acides aminés qui ne sont pas engagés définitivement dans la réaction.

D'autre part, les travaux de DRAUERT et HAGEN (1970) montrent que la composition glucidique du moût ne varie pas de façon significative au cours de la cuisson.

TABLEAU (XIX)
Concentration des sucres réducteurs et des
acides aminés dans les moûts modèles

Sucres réducteurs	Concentration (g/l)
Maltose	50
Glucose	10
Fructose	3
Acides aminés	Concentration (g/l)
Lysine	149
Histidine	57
Arginine	138
Acide glutamique	64
Glycocolle	23
Alanine	98
Valine	119
Méthionine	25
Phénylalanine	137
Proline	457
Leucine	181

Nous avons alors entrepris une étude sur des moûts modèles pour connaître l'importance relative de différentes réactions de brunissement et l'influence de différentes catégories d'acides aminés sur la formation de la couleur du moût. Nous avons également suivi l'évolution des acides aminés et des glucides au cours de la cuisson des moûts modèles pour pouvoir tenir compte de leur degré d'engagement dans ces réactions.

6.2. TECHNIQUES EXPERIMENTALES

6.2.1. Préparation des moûts modèles

Cinq moûts modèles de différentes compositions ont été préparés dans une solution de tampon phosphate à pH 5,2.

- 1) Contenant seulement les sucres réducteurs principaux du moût conventionnel.
- 2) Contenant les sucres réducteurs + 1,07 g/l du glycolle (soit 200 mg/l de l'azote α -aminé)
- 3) Contenant les sucres réducteurs + les acides aminés basiques
- 4) Contenant les sucres réducteurs + les acides aminés acides et neutres
- 5) Contenant les sucres réducteurs + les deux groupes d'acides aminés.

Les concentrations des sucres réducteurs et des acides aminés dans ces moûts qui ont été fixés d'après les données sur la composition du moût dans l'ouvrage de HOUGH et al. (1971) sont présentées dans le tableau (XIX).

Couleur
unités ASBC

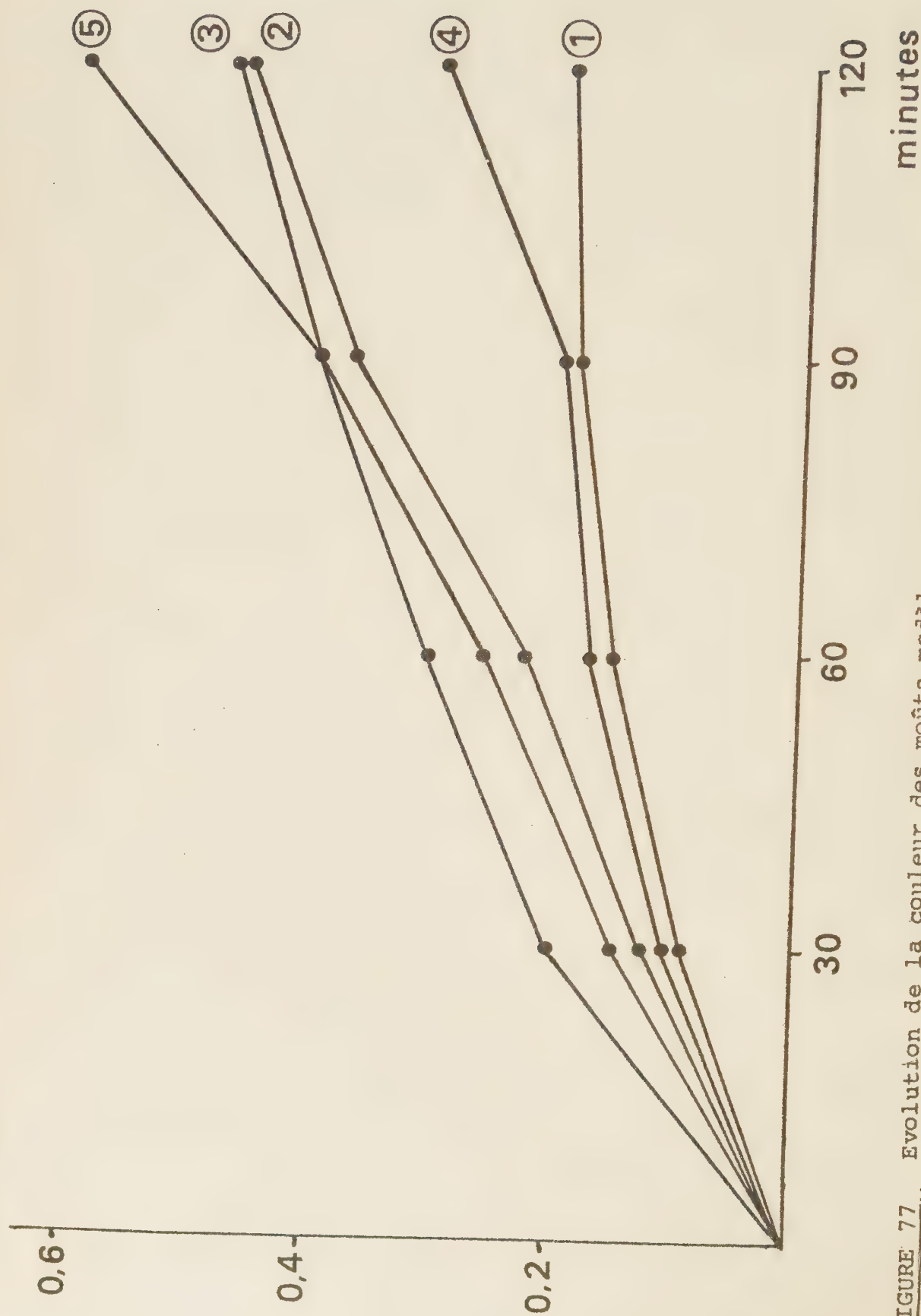


FIGURE 77

Evolution de la couleur des mouls modèles au cours de la cuisson.
Composition des modèles :

- ① - Maltose - Glucose - Fructose - MGF ;
- ② - MGF + 1,07 de glycocolle ;
- ③ - MGF + AAB + AAN
- ④ - MGF + AAB + AAN
- ⑤ - MGF + AAB + AAN

La cuisson des moûts modèles a été effectuée selon la méthode de KOLBACH-ZASTROW décrite au chapitre 1.1.3. Les échantillons prélevés toutes les 30 minutes, ont été analysés.

6.2.2. Méthodes analytiques

2.1. Mesure de la couleur

Etant donné la faible coloration des échantillons, les mesures ont été effectuées au moyen d'un spectrophotomètre BECKMAN à 430 nm, selon la méthode standard de l'ASBC.

2.2. Détermination des réducteurs

Les substances réductrices formées à la cuisson ont été déterminées selon la méthode de ADACHI décrite au chapitre 5.3.2.

2.3. Dosage des acides aminés et des sucres réducteurs

Nous avons utilisé les mêmes méthodes décrites au chapitre 1.1.3.

6.3. RESULTATS ET DISCUSSION

La figure (77) illustre l'évolution de la couleur des moûts modèles au cours de la cuisson.

La couleur du modèle contenant seulement les sucres réducteurs évolue de façon régulière et elle atteint une valeur de 0,20 unité au bout de 2 heures de chauffage à 108°C.

La présence d'acides aminés et neutres modifie légèrement cette allure et on obtient une coloration de 0,30 unité ASBC à la fin de la cuisson. Tandis que dans le cas des acides aminés basiques la formation de la coloration est très fortement accélérée.

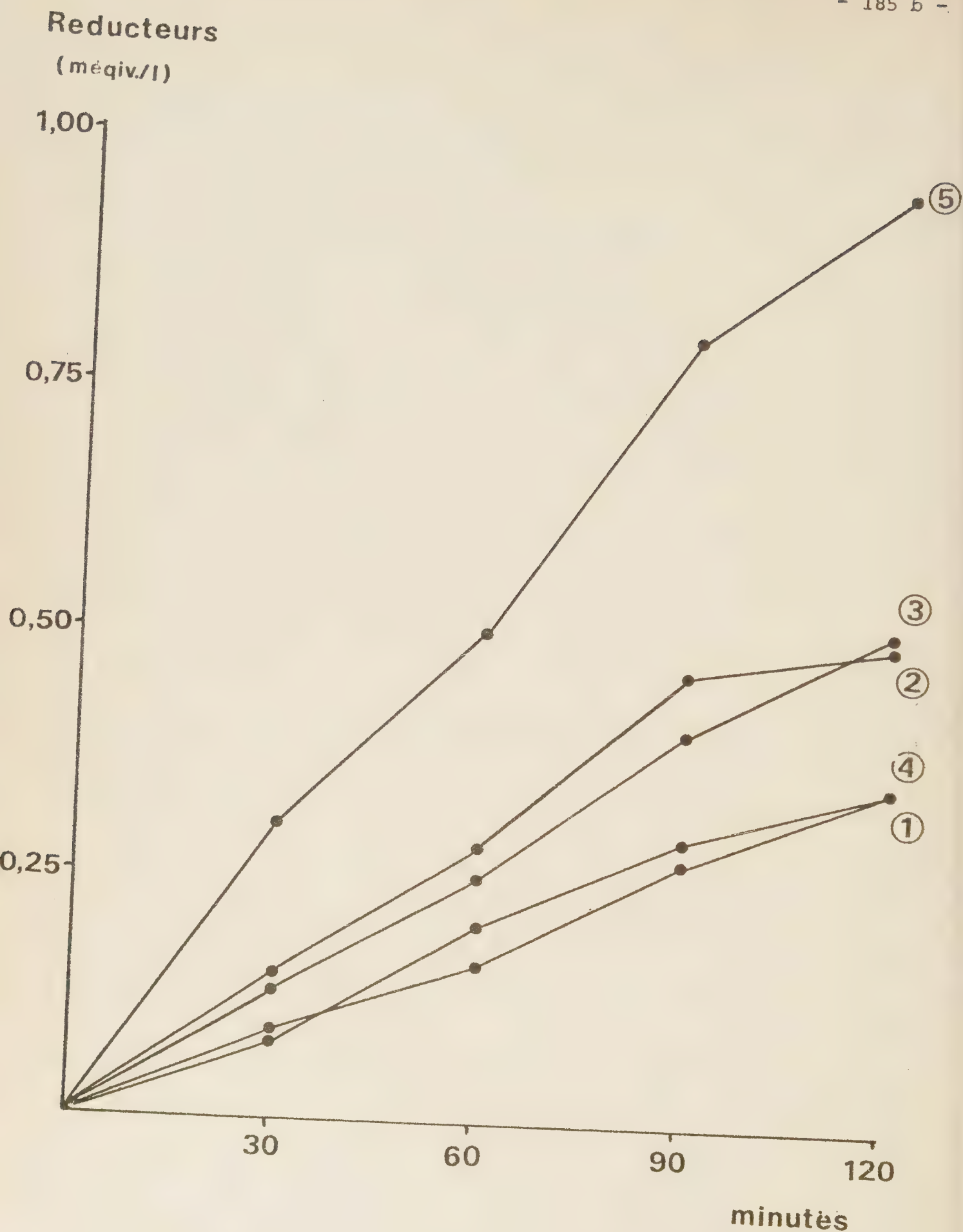


FIGURE 78 Evolution des réducteurs dans les moûts modèles au cours de la cuisson (pour la légende, voir la figure 77)

La valeur finale atteinte est de 0,47 unité ASBC pour le modèle contenant des sucres réducteurs et des acides aminés basiques, et 0,60 unité ASBC pour le modèle contenant les sucres réducteurs et ces deux groupes d'acides aminés.

La formation de la coloration du modèle contenant des sucres réducteurs et 200 mg/l d'azote alpha-aminé sous forme de glycolle est également intense, elle atteint une valeur légèrement inférieure à celle obtenue dans le modèle contenant les acides aminés basiques.

Quoiqu'il en soit, la coloration formée dans ces mouls modèles est toujours inférieure à celle qui se forme pendant la cuisson dans les mêmes conditions d'un moult conventionnel préparé à partir d'un malt pâle.

En effet, les modèles contenant tous les acides aminés donne une coloration mesurable par la méthode EBC. La valeur finale obtenue est de 1,25 unité EBC, alors que la coloration d'un moult conventionnel se multiplie en général par un facteur variable de 1,5 à 2,5 après la cuisson.

Etant donné que les réactions de Maillard ou les réactions de caramélisation donnent naissance à des substances réductrices, l'étude de leur évolution dans nos modèles au cours de la cuisson peut nous donner des indications intéressantes.

Les résultats présentés dans la figure (78) révèlent que les acides aminés et neutres n'ont pratiquement pas d'influence sur la formation des réducteurs, tandis que les acides aminés basiques la favorisent considérablement.

Dans le cas du modèle contenant ces deux groupes d'acides aminés, la courbe d'évolution se distingue nettement. Il s'agit là

TABLEAU (XX)

Variations relatives des teneurs en sucres réducteurs
des moûts modèles au cours de la cuisson

	Durée de la cuisson (minutes)			
	30	60	90	120
Modèle 1				
Fructose	103	103	106	106
Glucose	103	102	97	96
Maltose	180	99	97	96
Modele 2				
Fructose	100	102	100	100
Glucose	98	99	97	96
Maltose	101	101	103	104
modèle 3				
Fructose	100	100	100	100
Glucose	100	98	98	96
Maltose	102	100	100	103
Modèle 4				
Fructose	97	100	100	97
Glucose	97	99	99	99
Maltose	99	97	97	97
Modèle 5				
Fructose	94	100	94	94
Glucose	97	100	97	94
Maltose	99	100	100	96

peut-être de l'effet synergétique de ces acides aminés sur la formation des réducteurs.

Nous avons ensuite étudié l'évolution des teneurs en acides aminés des moûts modèles au cours de nos essais de cuisson.

Les histogrammes des figures (79, 80, 81, 82) illustrent de telles évolutions.

Dans le moût modèle contenant 200 mg/l d'azote alpha-aminé sous forme de glycoColle, on constate une légère baisse de l'ordre de 6 % (Fig. 79).

Le taux des acides aminés du modèle qui renferme seulement les basiques, diminue en moyenne de 15 % à la cuisson. L'histidine paraît la plus sensible suivie par l'arginine et la lysine (Fig. 80).

Les changements que l'on observe dans le cas des acides aminés acides et neutres, ne semblent pas significatifs, sauf pour la méthionine dont le taux décroît de l'ordre de 10 % au bout de 2 heures de cuisson (Fig. 81).

Les résultats concernant le modèle contenant tous les acides aminés, présentés dans la figure (82) révèlent la diminution importante (de l'ordre de 15 %) des teneurs en acides aminés basiques au cours de la cuisson. Parmi les acides aminés acides et neutres, seule la méthionine paraît avoir subi une destruction significative.

L'évolution des teneurs en sucres réducteurs des modèles pendant la cuisson est présentée dans le tableau (XX).

Ces résultats ne nous permettent pas de conclure en ce qui concerne le degré d'engagement des sucres réducteurs dans les réactions de brunissement au cours de la cuisson. Les variations que l'on constate restent dans la marge d'erreur de la méthode de dosage.

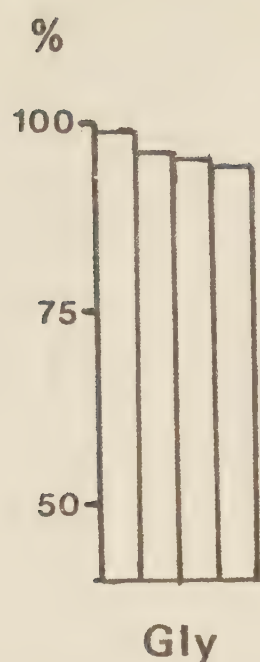


FIGURE 79 Evolution de l'acide aminé du modèle MGF + 1,07 g Glycocolle (% d'acide aminé retrouvé après 30, 60, 90, 120 minutes de cuisson)

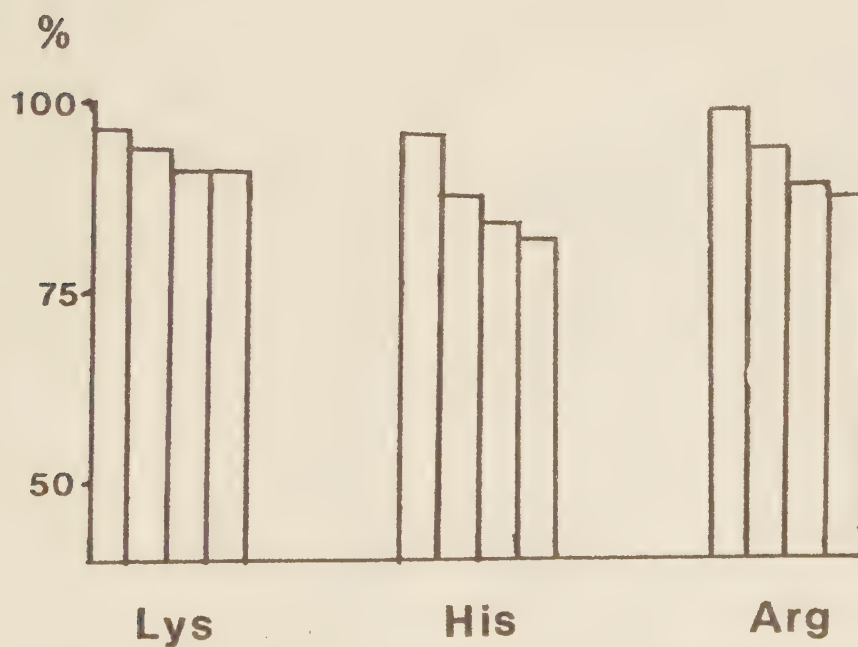


FIGURE 80 Evolution des acides aminés du modèle MGF + AAB (% d'acide aminé retrouvé après 30, 60, 90, 120 minutes de cuisson)

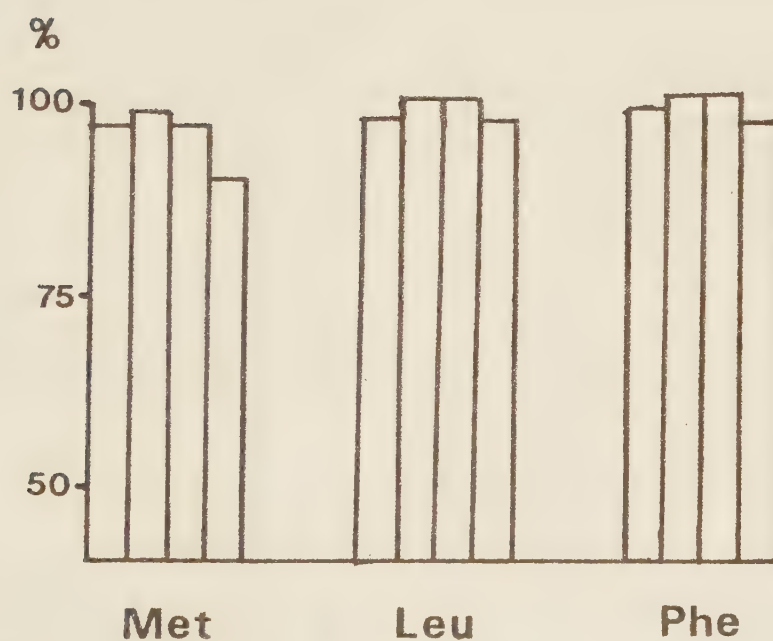
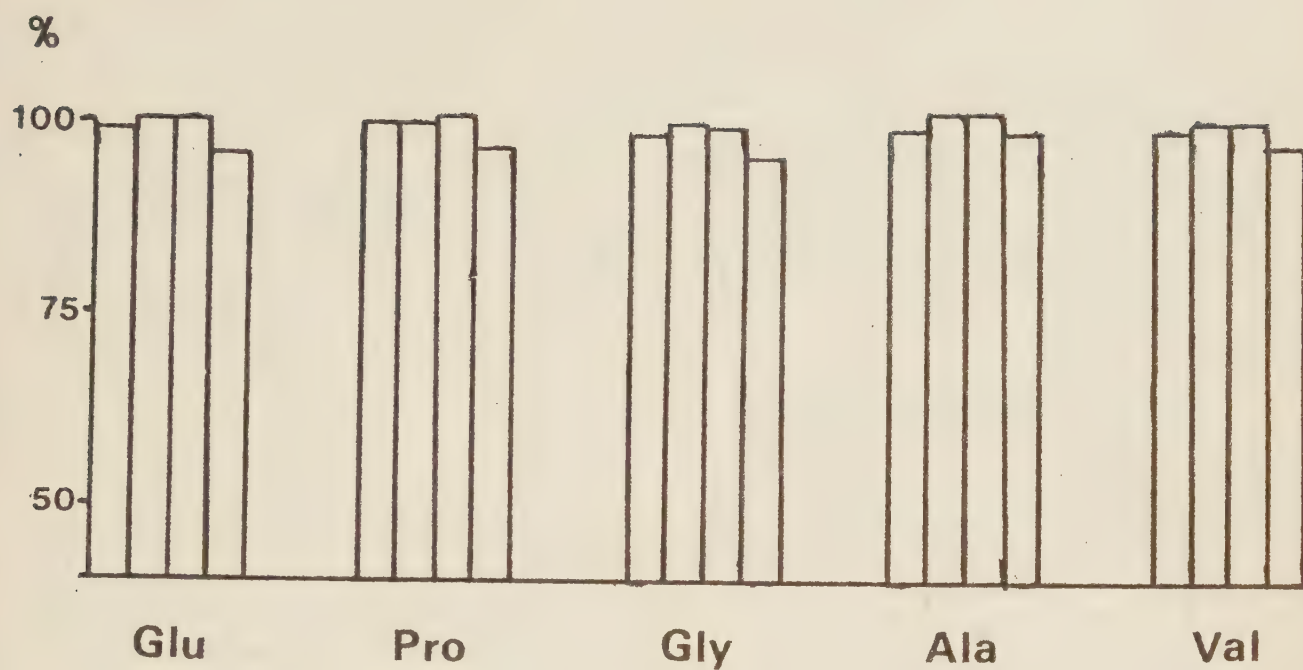
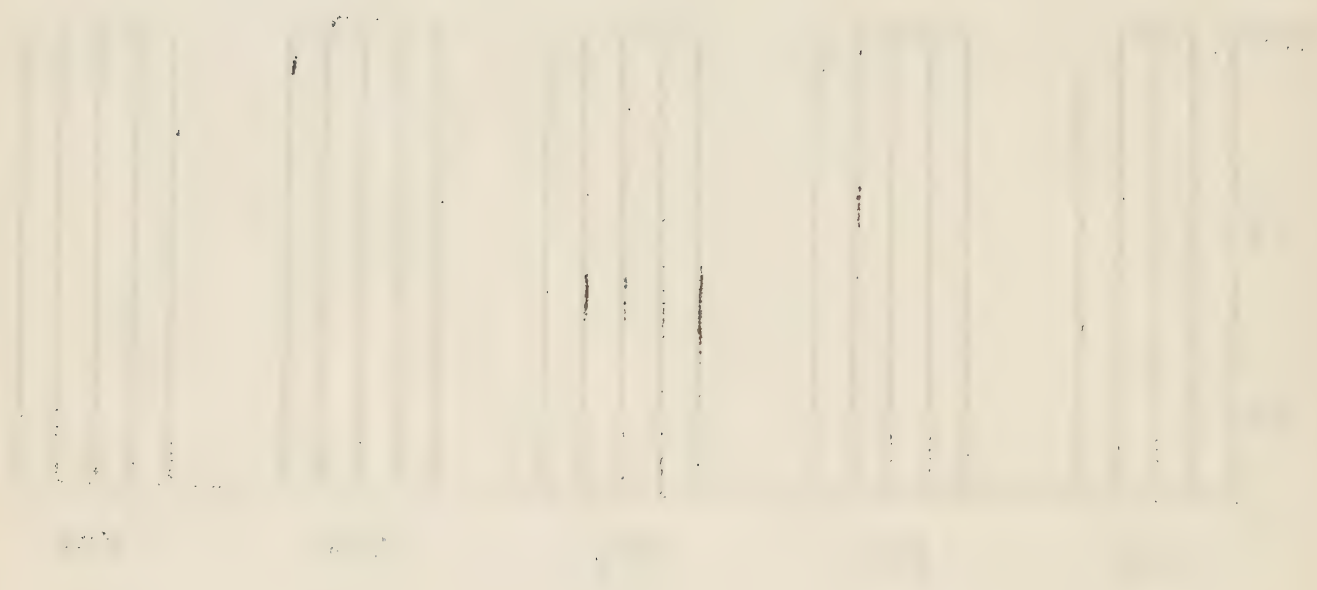


FIGURE 81 Evolution des acides aminés du modèle MGF + AAAN
(% d'acide aminé retrouvé après 30, 60, 90, 120 minutes de cuisson)



Faint, illegible text at the bottom of the page, possibly a caption or footer.

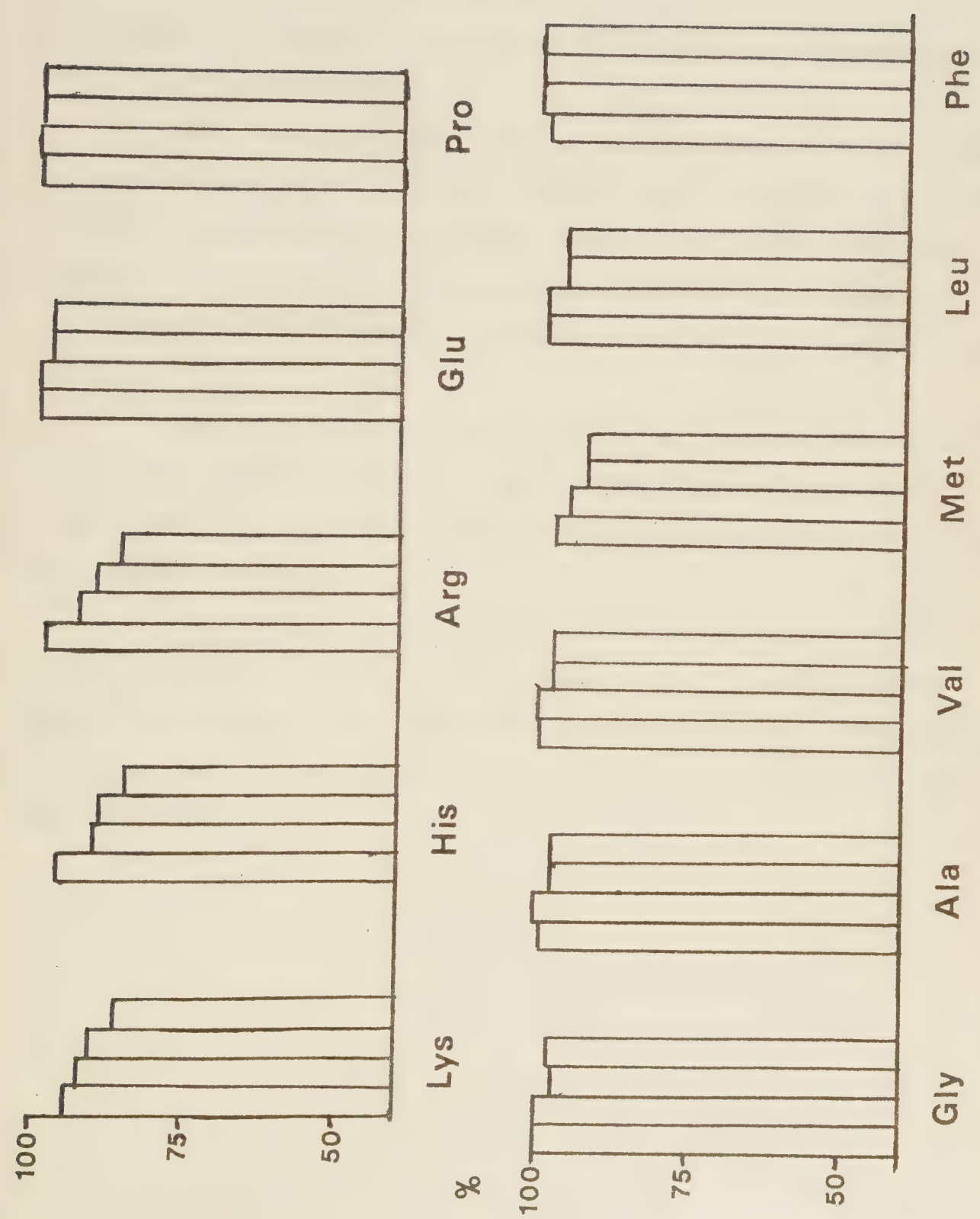


FIGURE 82. Evolution des acides aminés du modèle MGF + AAB + AAAN (% d'acide aminé retrouvé après 30, 60, 90, 120 minutes de cuisson)

6.4. CONCLUSIONS

La question de brunissement du moût au cours de la cuisson est abordée en effectuant des essais sur des solutions modèles simulant le moût conventionnel.

Les résultats expérimentaux montrent tout d'abord l'influence considérable de la présence d'acides aminés notamment des basiques tant sur la formation de la couleur que sur celle des réducteurs. Cependant, l'intensité de la coloration formée dans de telles solutions est inférieure à celle qui se forme au cours de la cuisson d'un moût naturel.

Cela se comprend par le fait de la présence dans le moût d'une part, d'autres composés comme les peptides qui sont très actifs dans les réactions de Maillard, et d'autre part, des prémélanoidines provenant du malt.

En suivant l'évolution des acides aminés au cours des essais, nous avons montré la participation importante des acides aminés basiques dans les réactions de brunissement des moûts modèles ; alors que dans le cas des sucres réducteurs, cela n'apparaît pas de façon évidente.

7. CONCLUSIONS GENERALES

Les réactions de brunissement qui interviennent dans la chaîne d'opérations de maltage, influencent de façon déterminante les diverses qualités du malt, entre autre, sa couleur, son arôme et sa teneur en réducteurs.

Cependant, ces phénomènes sont d'une grande complexité, en raison du nombre des constituants chimiques du malt vert en présence et de l'interférence des paramètres physiques comme le temps, la température et l'état de l'eau dans le malt (sorption).

Nous nous sommes attachés, dans ce présent travail, à étudier certains aspects technologiques et biochimiques des réactions de brunissement non-enzymatique en liaison avec la qualité du malt.

L'étude des transformations biochimiques du malt vert au cours du coup de feu nous a d'abord confirmé le rôle de la zone critique de la température entre 80 et 85°C sur la formation de la couleur et de la surcoloration du malt ; elle a de façon précise montré la participation des acides aminés et particulièrement des basiques dans les réactions de brunissement au coup de feu.

Elle a ensuite bien mis en évidence le rôle préparatoire du touraillage et du coup de feu à la formation de la couleur du moût bouilli (test Kolbach-Zastrow) qui préfigure sensiblement la couleur du moût à la fin de l'ébullition en chaudière.

Le rôle original de la zone critique de la courbe de sorption vers 6 % d'humidité est mise en évidence tant dans la formation de la couleur, de la surcoloration que dans celle des substances réductrices et des cétose-amines du malt. Cela nous apparaît comme très important pour le malteur dans la pratique et nécessitera des recherches

complémentaires. D'autre part, l'existence d'une hydrolyse enzymatique de l'amidon par l'alpha-amylase est très probable au coup de feu.

Les réactions de Maillard qui sont déjà très sérieusement amorcées au coup de feu, peuvent continuer leur déroulement au cours de l'ensilage du malt. Ce phénomène est plus ou moins intense en fonction de la température et de la durée du stockage.

L'étude expérimentale réalisée à ce sujet nous a permis de conclure qu'il est raisonnable de stocker le malt à une température au plus égale à 35°C en silo, si l'on veut maintenir sa qualité avant le brassage.

Ayant mis en évidence l'importance du degré d'humidité du malt sur les transformations qui ont lieu au coup de feu, nous nous sommes ensuite préoccupés d'étudier les phénomènes de sorption dans le malt en relation avec la variété d'orge et de son niveau de désagrégation.

Les résultats expérimentaux ont montré que les activités enzymatiques et les réactions chimiques dans le malt vert au cours des conditions déterminées de séchage et du coup de feu, vont se manifester d'une manière plus ou moins intense d'une part, selon la variété d'orge au départ, d'autre part, selon le niveau de désagrégation après la germination par suite des modifications bio-physico-chimiques que subit le grain d'orge, comme la dégradation des macromolécules et l'apparition des pores. Tout cela conditionne l'état de liaison de l'eau dans le malt. Ces variations dans la qualité du malt vont jouer, en outre, un rôle déterminant sur la vitesse de séchage. Par exemple, pour une même variété, un malt bien désagrégué aura tendance à sécher plus facilement qu'un malt relativement moins bien désagrégué.

Les cétose-amines sont des produits intermédiaires très importants des réactions de Maillard.

L'étude entreprise pour l'isolement et l'identification de ces composés à partir d'un extrait de malt a révélé la présence d'un grand nombre de cétose-amines provenant de la réaction de différents sucres réducteurs avec différents acides aminés du malt. Cela étant, les techniques auxquelles nous avons fait appel en tenant compte des informations bibliographiques, ne nous ont pas permis d'obtenir une séparation suffisante de ces composés. Par conséquent, pour des raisons de matériel scientifique, les travaux d'identification n'ont pu être achevés.

Néanmoins, l'analyse des hydrolysats obtenus par traitement acide nous a apporté des précisions sur l'identité des acides aminés inclus dans leurs molécules. Ainsi, nous avons trouvé principalement du glycocolle, de l'acide aspartique, de l'acide glutamique, de la valine et de l'alanine dans les hydrolysats de différents constituants isolés.

L'importance des cétose-amines sur le plan technologique en brasserie vient non-seulement du fait qu'elles sont précurseurs de coloration et d'arômes mais aussi de leurs propriétés réductrices pour le moût et pour la bière.

Par conséquent, des études sur leur isolement, leur identification et si possible leur dosage dans le malt, dans le moût et dans la bière devront être entreprises en faisant appel à des techniques mieux appropriées.

L'une des répercussions importantes des réactions de brunissement non-enzymatique en malterie, est leur contribution à la richesse en réducteurs naturels du malt.

Ce dernier renferme en outre des réducteurs d'autres origines et notamment les dérivés polyphénoliques.

Cependant, les substances réductrices issues des réactions de brunissement non-enzymatique sont les plus intéressantes sur le plan technologique. Elles sont généralement considérées comme inoffensives voire même protectrices en évitant l'altération des qualités organoleptiques de la bière, due aux phénomènes d'oxydation.

Pour le dosage des réducteurs du malt, nous avons mis au point deux méthodes ; l'une pour les "réducteurs rapides" (méthode de MIT SUDA), l'autre pour les "réducteurs totaux" (méthode de ADACHI).

Afin de mieux apprécier la richesse en réducteurs non polyphénoliques du malt, les dosages sur des moûts conventionnels ont été effectués *avant* et *après* l'élimination des substances polyphénoliques par traitement à l'agent AT qui adsorbe les polyphénols.

L'étude statistique réalisée à partir des résultats de dosage effectués sur un lot de 57 malts pâles industriels provenant de 17 malteries différentes, montre tout d'abord la variabilité considérable de ces grandeurs mesurées dans cette population. Elle met ensuite bien en évidence l'interdépendance des teneurs en réducteurs (polyphénols, réductones, mélanoidines, etc...) avec le niveau de désagrégation du malt. Par ailleurs, les corrélations étroites trouvées entre les teneurs en "réducteurs totaux" non polyphénoliques d'une part, la couleur et notamment la surcoloration du malt d'autre part, nous témoignent de leur parallélisme avec les mélanoidines du malt.

Cette étude s'avère d'un grand intérêt pratique pour le maltteur et le brasseur en raison de l'importance primordiale des problèmes d'oxydation en brasserie et leur incidence sur la stabilité colloïdale et la stabilité organoleptique de la bière.

Par les méthodes de dosage décrites dans ce travail et en particulier par la méthode de Adachi, on peut obtenir des renseignements très utiles pour la mise au point des fabrications.

Nous avons enfin abordé la question du brunissement du moût au cours de la cuisson en effectuant des tests de Kolbach-Zastrow sur des solutions modèles simulant le moût conventionnel.

Les résultats ont démontré que la formation de la couleur et celle des substances réductrices sont fortement influencées par la présence d'acides aminés et notamment des basiques (lysine, histidine, arginine).

Ils nous ont permis de conclure d'autre part que l'augmentation de la couleur d'un moût naturel au cours du test Kolbach-Zastrow n'est pas due uniquement aux réactions des acides aminés avec les oses. Il peut y avoir dans ce cas, l'intervention d'autres facteurs comme la présence de peptides réactionnels et de prémélanoïdines dans un moût conventionnel.

En résumé, le présent travail de recherche effectué dans la Chaire de Malterie-Brasserie de l'E.N.S.I.A., à Douai, a mis en évidence plusieurs points importants pour la technologie du maltage, pour la maîtrise de la qualité du malt dans le domaine difficile des réactions de brunissement non-enzymatique du malt.

Comme toute recherche scientifique, ce travail ouvre de nouvelles perspectives, en particulier dans le domaine des cétoamines, des réducteurs du malt et des phénomènes physiques de sorption en liaison avec la variété de l'orge et le niveau de désagrégation. Ces nouvelles voies mériteraient d'être explorées plus à fond, afin d'assurer une maîtrise améliorée de la germination et du touraillage.

B I B L I O G R A P H I E

- ACKER L. (1962)
Adv. Food. Res., 11, 263-330
- ADACHI S. (1958)
J. Agr. Chem. Soc. Japan, 32, 313-316
- ADRIAN J. (1963)
Ann. Nutrit. Alim., 17, 1-35
- ADRIAN J. (1965)
Ann. Nutrit. Alim., 19, 27-45
- ADRIAN J. (1967)
Ann. Nutrit. Alim., 21, 129-147
- ADRIAN J. (1973 a)
Ind. Alim. Agric., 90, 559-564
- ADRIAN J. (1973 b)
Ann. Nutrit. Alim., 27, 299-314
- ADRIAN J., FAVIER J.C. (1961)
Ann. Nutrit. Alim., 15, 181-225
- ADRIAN J., FRAGNE R. (1972)
Ann. Nutrit. Alim., 26, 97-119
- ANET E.F.L.J. (1959 a)
Australian J. Chem., 12, 280-287
- ANET E.F.L.J., REYNOLDS T.M. (1957)
Australian J. Chem., 10, 182-192
- APEL K., SCHILFARTH H. (1958)
Brauerei Wiss. Beilage, 11, 121
- ARAYA S. (1947)
Nippon Seikagakkai Shi., 19, 143. C.A., 1952, 46, 2595
- ARKIMA V., RONKAINEN P. (1971)
Msch. Brauerei, 24, 161-163
- ARROYO P.T., LILLARD D.A. (1970)
J. Food. Sci., 35, 769-776
- BARNES H.M., KAUFMAN C.W. (1947)
Industr. Engng Chem., 39, 1167-1172
- BARRETT J., GRIFFITHS C.M., KIRSHOP B.H. (1967)
J. Inst. Brew., 73, 445-450
- BARUAH P., SWAIN T. (1959)
J. Sci. Food. Agric., 10, 125
- BARWALD G., NIEFIND H.J., HOMPL U. (1969)
Msch. Brauerei, 22, 114-117
- BATHGATE G.N. (1973)
Brewers' Digest, 48, 4, 60-65
- BAVISOTTO V.S., ROCH L.A. (1959)
Proc. Amer. Soc. Brew. Chem., 63-75

- BAVISOTTO U.S., ROCH L.A. (1960)
Proc. Amer. Soc. Brew. Chem., 101-112
- BECKER H.A., SALLANS H.R. (1956)
Cereal Chem., 33, 79-91
- BEDROSIAN K., NELSON A.I., STEINBERG M.P. (1959)
Food. Technol., 13, 722-726
- BEEVERS H., JAMES W.O. (1948)
Biochem. J., 43, 636-642
- BENARD M., SCRIBAN R. (1972)
Bios., n° 3, 129-134
- BENDALL D.S., GREGORY R.P.F. (1963)
"Purification of phenoloxidase"
In "Enzymic chemistry of phenolic compounds"
J.B. PRIDHAM, ed., Pergamon Press, Oxford, 7-24
- BESSEY O.A. (1938)
J. Biol. Chem., 126, 771
- BIMBENET J.J. (1969)
Influence des réactions de Maillard dans les Industries Alimentaires.
Thèse, Fac. de Sci. de Paris
- BLACKHALL A., THOMSON R.H. (1953)
J. Chem. Soc., 1138
- BLOCKMANS C., DEVREUX A., MASSCHLEIN C.A. (1975)
Abs. Proc. Eur. Brew. Conv., 15 th Congr. Nice, 1975
Elsevier Amsterdam, 117
- BLOCKMANS C., DUJARDIN M.C. (1973)
BIF, 16, 83-87
- BOBBIO F.O., BOBBIO P.A., TREVISAN L.M.V. (1973)
Sci. Technol. Alim. (ZURICH), 6, 215-218
- BORSOOK H., ABRAMS A., LOWY H.P. (1955)
J. Biol. Chem., 215, 111-124
- BOHART G.S., CARSON J.F. (1955)
Nature, 175, 470-471
- BRAVERMANN J.B.S. (1963)
"Introduction to the Biochemistry of Foods"
Elsevier, Amsterdam, 294-313
- BURTON H., DAVID S.B. (1952)
J. Chem. Soc., London, 2193-2196
- BURTON H.S., MCWEENY D.J. (1962)
Proc. 1st Congr. Food Sc. Technol., 1, 217-225
- BURTON H.S., MCWEENY D.J. (1963)
Nature, 197, 266-268
- BURTON H.S., MCWEENY D.J., BILTCLIFFE D.D. (1963)
J. Sci. Food Agric., 14, 911-920

- CARSON J.F. (1955)
J. Amer. Chem. Soc., 77, 5957
- CASE A.C., THOMPSON E.H. (1961)
J. Inst. Brew., 67, 513-525
- CHAPMAN R.A., MCFARLANE W.D. (1945)
Canad. J. Res., 23, 91-99
- CHAPON L., CHEMARDIN M. (1964)
Proc. Amer. Soc. Brew. Chem., 244-258
- CHAPON L., KRETSCHMER K.F. (1970)
Brauwelt, 110, 395-405
- CHAPON L., LOUIS C. (1974)
Bios, 11, 448-456
- CHAPON L., LOUIS C., CHAPON S. (1971)
Proc. Europ. Brew. Conv. 13th Cong., Estoril 1971,
Elsevier Amsterdam 1972, 307-322
- CHICHESTER C.O., STADMAN F.H., MAC KINNEY G. (1952)
J. Amer. Chem. Soc., 74, 3418-3420
- CHODAT R. (1912)
Arch. Sci. Phys. Nat., 33, 70
- CHUYEN N.Y., KURATA T., FUJIMAKI M. (1973)
Agr. Biol. Chem., 37, 327-334
- CLARK A.V., TANNENBAUM S.R. (1970)
J. Agr. Food Chem., 18, 891-894
- COLLINS E. (1971)
J. Agr. Food Chem., 19, 533-535
- CRAFT C.C. (1966)
Amer. Potato J., 43, 112-121
- CRAFT C.C., AUDIA W.V. (1962)
Bot. Gaz. (Chicago), 123, 211
- CROWE L.K., JENNESS R., COULTER S.T. (1948)
J. Dairy Sci., 31, 595-610
- DAMM E., KRINGSTAD H. (1964)
J. Inst. Brew., 70, 38-42
- DE CLERCK J., VAN CAUWENBERGE H. (1956)
Bull. Ass. Ec. Brass., Louvain, 52, 1-23
- DEVREUX A. (1973)
Fermentatio, 69, 7-16
- DIEMAIR W., LOTZBEYER E. (1949)
Z. Lebensm. Untersch. -Forsch., 89, 125
- DIMICK K.P., PONTING J.D., MAKOWER B. (1951)
Food Technol., 5, 237
- DRAPRON R., GUILBOT A. (1962 a)
Ann. Technol. Agric., 11, 175-218

- DRAPRON R., GUILBOT A. (1962 b)
Ann. Technol. Agric., 11, 275-371
- DRAWERT F., HAGEN W. (1970)
Brauwissenschaft, 23, 95-101
- DUTOIT M.M.S., PAGE H.J. (1932)
J. Biol. Chem., 40, 131-140
- EICHNER K., KAREL M. (1972)
J. Agr. Food Chem., 20, 218-223
- ELLIS G.P. (1959)
Adv. Carbohydr. Chem., 14, 63-134
- ELLIS G.P., HONEYMAN J. (1955)
Adv. Carbohydr. Chem., 10, 95-168
- EL'ODE K.E., DORNSEIFER T.P., KEITH E.S., POWERS J.J. (1966)
J. Food Sci., 31, 351 - 358
- EMBS R.J., MARKAKIS P. (1965)
J. Food Sci., 30, 753-758
- ENDERS C. (1943)
Woch. Brau., 60, 98-104
- ENDERS C., THEIS K. (1938)
Brennstoff. Chem., 19, 360-402
- ESKIN N.A.M., HENDERSON H.M., TOWNSEND R.J. (1971)
In "Biochemistry of Foods", Academic Press,
New-York - London, 69-108
- EVELYN K.A., MALLOY H.T., ROSEN C. (1938)
J. Biol. Chem., 126, 645
- FAGERSON I.S. (1969)
J. Agr. Food Chem., 17, 747-750
- FERRETTI A., FLANAGAN V.P. (1971)
J. Agr. Food Chem., 19, 245-249
- FINKLE B.J., NELSON R.F. (1963)
Nature, 197, 901-903
- FLING M., HOROWITZ N.H., HEINEMANN S.F. (1963)
J. Biol. Chem., 238, 2045-2053
- FLORKIN M., STOTZ E.H. (1965)
"Comprehensive Biochemistry", vol. 13,
"Enzyme Nomenclature" - 2nd ed. Elsevier,
Amsterdam
- FOLIN O., MALMROS H. (1929)
J. Biol. Chem., 83, 115-120
- FRAGNE R. (1972)
*Comportement de la lysine de quelques protéines
au cours de la réaction de Maillard
Diplôme d'Etudes EPHE*
- FRANZKE C., IWAINSKI H. (1954)
Deut. Lebensm - Rundschau, 50, 251

- FUJIMAKI M., CHUYEN N.V., KURATA T. (1971)
Agr. Biol. Chem., 35, 2043-2049
- GEHMAN H., OSMAN E.M. (1954)
Adv. Food Res., 5, 53
- GOMYO T., KATO H., UDAKA K., HORIKOSHI M., FUJIMAKI M. (1972)
Agr. Biol. Chem. 36, 125-132
- GRAY P.P., STONE I. (1939)
Wallerstein Lab. Comm., n° 5, 5
- GREENSHIELDS R.N. (1973)
Process Biochem., 8, n° 4, 17-20
- GREENSHIELDS R.N., MACGILLIVRAY A.W. (1972)
Process Biochem., 7, n° 12, 11-16
- GREGG D.C., NELSON J.M. (1940)
J. Amer. Chem. Soc., 62, 2510-2512
- GREGORY R.P.F., BENDALL D.S. (1966)
Biochem. J., 101, 569-581
- GUSS C.O. (1952)
Work at Colorado State College on the Chemistry of browning. In "Contributions of Browning Research to Ratio item Stability", MITCHELL J. H., PETERSON M. S. eds., Research and Development Associates, Food and Container, Inc. Chicago, 26-29
- HAGEDORN H.C., JENSEN B.N. (1923)
Bioch. Zeit., 135, 46 Cité par LOISELEUR J.,
"Techniques de Laboratoire" Chimie physique, Chimie biologique
Paris, 1963, Tome I, Fasc. 2, 1339-1342
- HAGERDAL B., LÖFQVIST B. (1973)
J. Agr. Food Chem., 21, 445-451
- HALL R.D., HARRIS G., MCWILLIAM I.C. (1956)
J. Inst. Brew., 62, 232-238
- HAREL E., MAYER A.M. (1971)
Phytochemistry, 10, 17-22
- HAREL E., MAYER A.M., SHAIN Y. (1965)
Phytochemistry, 4, 783-790
- HARRIS G., MCWILLIAM I.C. (1954)
J. Inst. Brew., 60, 149-157
- HARTONG B.D. (1934)
Woch. Brau., 51, 409
- HARTONG B.D., KRETSCHMER K.F. (1968)
Brauwelt, 108, 517-523
- HASHIBA H. (1973 a)
Agr. Biol. Chem., 37, 871-877
- HASHIBA H. (1973 b)
Nippon Nogei Kagaku Kaishi, 47, 289-291

- HASHIMOTO N. (1972)
J. Inst. Brew. 78, 43-51
- HASHIMOTO N. (1973)
Rept. Res. Lab. Kirin Brewery Co., Ltd, 16, 1-9
- HASHIMOTO N., KOIKE K. (1971)
Rept. Res. Lab. Kirin Brewery Co., Ltd, 14, 1-12
- HATHWAY D.E., SEAKINS J.W.T. (1957)
Biochem. J., 67, 239
- HENDEL C.E., SILVEIRA V.G., JARRINGTON W.O. (1955)
Food Technol., 9, 433-438
- HENDRICKSON R.L. (1956)
Food Technol., 10, 1, cité par BRAVERMANN (1963)
- HERZ W.J., SHALLENBERGER R.S. (1960)
Food Res., 25, 491-494
- HODGE J.E. (1953)
J. Agr. Food Chem., 1, 928-943
- HODGE J.E. (1955)
Adv. Carbohyd. Chem., 10, 169-205
- HODGE J.E. (1967)
Origine of flavors in foods : Non enzymic Browning reaction. In "Chemistry and Physiology of flavors"
edit. H.W. Schultz
Avi. Publ. Co. Wesport. Connecticut, 465-491
- HODGE J.E., FISHER B.E., NELSON E.C. (1963)
Proc. Amer. Soc. Brew. Chem., 84-92
- HODGE J.E., MILLS F.D., FISHER B.E. (1972)
Cereal Science to-day, 17, 34-38
- HOUGH J.S., BRIGGS D.E., STEVENS R. (1971)
Malting and Brewing Science, Chapman and Hall ed., London.
- HURST D.T. (1972)
BFMIRA Sci. Tech. Surveys, 75, 1-72
- INGLES D.L. (1959, 1960 a, 1960 b, 1961, 1962)
Australian J. Chem., 12, 97 ; 13, 404 ; 13, 1159 ;
14, 1302 ; 15, 342
- INGLES D.L., REYNOLDS T.M. (1958)
Australian J. Chem., 11, 575-580
- ISBELL H.S., FRUSH H.L. (1958)
J. Org., Chem., 23, 1309
- ISEBAERT L. (1965)
Proc. Europ. Brew. Conv., 10 th Congr., Stockholm, Elsevier Amsterdam 1965, 36-40

- JACKSON H., KENDAL L.P. (1949)
Biochem. J., 44, 477-487
- JACOPSEN T., LIE S. (1974)
MBAA Tech. Quar., 11, 155-163
- JAMES W.O. (1953)
Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc., 28, 245
- JAMES W.O., ROBERTS E.A.H., BEEVERS H., DEKOCK P.C. (1948)
Biochem. J., 43, 626-635
- JANICEK G., POKORNY J. (1971)
Z. Lebensm Unters.-Forsch, 145, 142-147
- JERUMANIS J. (1970)
Etude sur le dosage des polyphénols en brasserie et leur évolution au cours de la fabrication
Thèse, Fac. Sci. Agr. Univ. Cath. Louvain
- JOHANSEN G., NICKERSON W.J. (1949)
Intern. Congr. Biochem. 1 st Congr. Cambridge,
Abs. Communs, 223
- JOHNSTON J.H.S. (1954)
J. Inst. Brew., 60, 318-342
- JONES M., PIERCE J.S. (1963)
Proc. Europ. Brew. Conv. 9 th Congr. Brussels,
Elsevier, Amsterdam 1964, 101-134
- JONES M., PIERCE J.S. (1967)
J. Inst. Brew., 73, 342-346
- JOSLYN M.A., BRAVERMANN J.B.S. (1954)
Adv. Food Res., 5, 97
- JOSLYN M.A., PONTING J.D. (1951)
Adv. Food Res., 3, 1-144
- JUST F. (1940)
Woch. Brau., 57, 13-25, 153-159
- JUST F., HOFER K. (1941)
Woch. Brau., 58, 111-116, 119-122, 139-145
- KATCHALSKY A. (1941)
Biochem. J., 35, 1024-1027
- KATCHALSKI A., SHARON N. (1953)
Biochim. Biophys. Acta., 10, 290
- KATO H. (1956)
Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 20, 273
- KATO H. (1962)
Agr. Biol. Chem., 26, 187-192
- KATO H., FUJIMAKI M. (1970)
Agr. Biol. Chem., 34, 1071-1077

- KATO H., GOMYO T., UDAKA K., FUJIMAKI M. (1971)
Nippon Nogeï Kagaku Kaishi, 45, 559-564
- KATO H., ISHIKAWA H., KASHIO H., TSUCHIDA H., FUJIMAKI M. (1975)
Nippon Nogeï Kagaku Kaishi, 49, 179-183
- KATO H., NOGUCHI G., FUJIMAKI M. (1968)
Agr. Biol. Chem., 32, 916-919
- KATO H., YAMAMOTO M., FUJIMAKI M. (1969)
Agr. Biol. Chem., 33, 939-948
- KEENY M., DAY E.A. (1957)
J. Dairy Sci., 40, 874-876
- KERTESZ D., (1952)
Biochim. Biophys. Acta, 9, 170-172
- KERTESZ D., ZITO R. (1965)
Biochim. Biophys. Acta, 96, 447-462
- KIELLY F.J., NOWLIN A.C., MORIATY J.H. (1960)
Cereal Sci. today, 5, 273-274
- KIRIGAYA N., KATO H., FUJIMAKI M. (1968)
Agr. Biol. Chem., 32, 287-290
- KITAOKA S., ONODERA K., (1962)
Agr. Biol. Chem., 26, 572
- KLOPPER W.J. (1956)
Brauwissenschaft, 9, 70-72
- KLOPPER W.J., DON J.R. (1961)
Brauwelt, 101, 786-789
- KOLBACH P., ZASTROW K. (1963)
Meschr. Brauerei, 16, 44-47
- KORT J.M. (1970)
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 25, 311-349
- KRISTER C.I. (1943)
U. S. Patent 2 315 626
Cité par DANEHY et PIGMAN (1951) Adv. Food Res.
3, 241-290
- KUBOTA T. (1941)
J. Biochem. (Tokyo), 34, 119
- KUBOWITZ F. (1937)
Biochem. Z., 292, 221
- LEA C.H., HANNAN R.S. (1949)
Biochim. Biophys. Acta, 3, 313-325
- LENTO H.G., UNDERWOOD J.C., WILLITS C.O. (1958)
Food Res., 23, 68-71
- LEWIS Y.M., ESSELEN W.B., FELLERS C.R. (1949)
Ind. Eng. Chem., 41, 2587-2591

- LIGHTBODY H.D., FEVOLDS H.L. (1948)
Adv. Food Res., 1, 149
- LINDEBERG G. (1950)
Nature, 166, 739-741
- LINDSAY R. (1973)
MBAA. Tech. Quart., 10, 16-19
- LINTNER C.I. (1912)
Z. f. ges. Brauw., 35, 545-548
- LONCIN M. (1961)
"Les opérations unitaires du génie chimique"
Dunod, Paris
- LONCIN M., JACWMAIN D., TUTUNDJIAN-PROVOST A.M., LENGES J.P.,
BIMBENET J.J. (1965)
C.R. Acad. Sci. Paris, 220, 3208-3211, Groupe 13
- LOON L.C. (1971)
Phytochemistry, 10, 503-507
- LOUIS C. (1972)
Les complexes du fer et du 2-2' dipyrédyle
Application à l'étude de l'oxydation des composés
polyphénoliques.
Thèse, Université de Nancy I.
- LUERS H., LAMPL P. (1955)
Brauwissenschaft, 8, 218-221
- MAILLARD L.C. (1912)
C.R. Acad. Sci., 66-68
- MAILLARD L.C. (1916)
Ann. Chim. (Paris), 11, 258
- MANDL B., WULLINGER F., WAGNER D., PIENDL A. (1970)
Brauwissenschaft, 23, 142-149
- MASON H.S. (1955 a)
Adv. Enzymol., 16, 105-184
- MASON H.S. (1955 b)
Nature, 175, 771-772
- MASON H.S. (1956)
Nature, 177, 79-81
- MASON H.S. (1957)
Adv. Enzymol., 19, 79-233
- MASSCHELEIN C.A., RAMOS-JEUNEHOMME C., DEVREUX A. (1961)
Proc. Europ. Brew. Conv., 8 th Congr., Vienna,
Elsevier, Amsterdam, 1961, 148-159
- MATHEW A.G., PARPIA H.A.B. (1971)
Adv. Food Res., 19, 75-145
- MCWEENY D.J., KNOWLES M.G., HEARNE J.F. (1974)
J. Sci. Food Agric., 25, 735-746

- MEILGAARD M. (1972)
Brewers ' Digest, 47, n° 4, 48-62
- MILLS F.D., BAKER B.G., HODGE J.E. (1969)
J. Agr. Food Chem., 17, 723-727
- MIRSKY A.E., ANSON M.L. (1936)
J. Gen. Physiol., 19, 451-459
- MITSUDA H., SHIKANAI T. (1957)
Vitamins (Japon), 13, 394-401
- MOTAI H. (1973)
Agr. Biol. Chem., 37, 1679-1685
- MOTAI H. (1974)
Agr. Biol. Chem., 38, 2299-2304
- MOTAI H., INOUE S. (1974)
Agr. Biol. Chem., 38, 233-239
- NAGAYAMA F. (1962)
J. Soc. Sci. Fish., 28, 45-48
- NARZISS L., RUSITZKA P., STIPPLER K. (1973)
Proc. Europ. Brew. Conv. 14 th Congr.,
Salzburg, Elsevier, Amsterdam, 1974, 85-98
- NARZISS L., SEKIN Y. (1974)
Brauwissenschaft, 27, 277-284
- OLCOTT H.S., DUTTON H.S. (1945)
Ind. Engng. Chem., 37, 1119
- OKUHARA A., SAITO N. (1970)
J. Ferment. Technol., 48, 177-189
- OMURA H., FUJITA A., SATO M., OTSUKI M., IIO M. (1974)
Sci. Bull. Fac. Agr. Kyushu Univ., 28, 79-92
- OWADES J.L., ZIENTARA F. (1960)
Proc. Amer. Soc. Brew. Chem., 68-71
- PATIL S.S., ZUCKER M. (1965)
J. Biol. Chem., 240, 3938-3943
- PATRON A. (1950)
Fruits d'Outre Mer, 5, 167-172
- PETIT L. (1959)
Ann. Technol. Agric., 1, 5-33
- POKORNY J., CON N.H., JANICEK G. (1973 a)
Z. Lebensm. Unters.-Forsch., 151, 305-309
- POKORNY J., CON N.H., JANICEK G. (1973 b)
Šorník VŠCHT Praze Ser. E., cité par POKORNY et al.
(1973 a)
- POLLOCK J.R.A., POOL A.A., REYNOLDS T. (1960)
J. Inst. Brew., 66, 389-394

- POLLOCK J.R.A., POOL A.A., REYNOLDS T. (1960)
J. Inst. Brew., 66, 389-394
- POMERANZ Y., JOHNSON J.A., SHELLENBERGER J.A. (1962)
J. Food Sci., 27, 350-354
- PONTING J.D. (1960)
The control of enzymatic browning of fruits.
In "Food Enzymes" (H.W. Schultz, ed.)
Avi. Publ. Co. Westport, Connecticut, 105
- PONTING J.D., JOSLYN M.A. (1948)
Arch. Biochem., 19, 47-63
- POUX C. (1966)
Ann. Technol. Agric., 15, 149-158
- REICH H., BOCK R.M. (1960)
Proc. Amer. Soc. Brew. Chem., 78-84
- REINER L., NARZISS L. (1972)
Brauwissenschaft, 25, 232-234
- REYNOLDS T.M. (1963)
Adv. Food Res., 12, 1-51
- REYNOLDS T.M. (1965)
Adv. Food Res., 14, 168-283
- REYNOLDS T.M. (1969)
Non-enzymic Browning Sugar-Amine Interactions in
"Symposium on Foods : Carbohydrates and their roles"
Ed. Schultz, Cain, Wrolstad
Avi. Publishing Co. Connecticut, 219-252
- RICHARDS E.L. (1956)
Biochem. J. 64, 639-644
- ROBERTS E.A.H. (1959)
Chem. Ind. (London), 995
- ROBINSON W.B., STOTZ E. (1945)
J. Biol. Chem., 160, 217
- ROONEY L.W., SALEM A., JOHNSON A.J. (1967)
Cereal Chem., 44, 539-550
- ROTHE M., VOIGT I. (1963)
Nahrung 1, 50-59
- RUBENTHALER G., POMERANZ Y., FINNEY K.F. (1964)
Cereal Chem. 41, 424-427
- RUCKDESCHEL W. (1914)
Z. f. ges. Braw., 37, 430-432
- SANDEGREN E., ENEBO L., GUTHENBERG H., LJUNGDAHL L. (1954)
Proc. Amer. Soc. Brew. Chem., 63-74
- SANDERSON G.W. (1965)
Biochem. J., 95, 24-25

- SAUNDERS J., JERVIS F. (1966)
J. Sci. Food Agric., 17, 245-249
- SCRIBAN R. (1971)
Bios., n° 12, 16-28
- SCRIBAN R., DUPONT D. (1973)
Proc. Europ. Brew. Conv. 14 th Congres, Salsburg, Elsevier, Amsterdam, 1974, 57-74
- SFAT M.R. (1965)
Brewers' Digest, 40, n° 6, 50-54
- SHAW P.E., TATUM J.H., BERRY R.E. (1967)
Carbohydrate Research, 5, 266-273
- SIEFKER J.A., POLLOCK E.G. (1956)
Proc. Amer. Soc. Brew. Chem., 5-12
- SIMON H., HEUBACH G. (1965)
Chem. Ber., 98, 3703-3711
- SIMON M., WAGNER J.R., SILVEIRA V.G., HENDEL C.E. (1955)
Food Technol., 9, 271
- SINGH R., SHEORAN I.S. (1972)
J. Sci. Food Agr., 23, 121-125
- SMIRNOV V.A., GEISPITS K.A. (1956)
Biokhimiya, 21, 633
- SMITH J.L., KRUEGER R.C. (1962)
J. Biol. Chem., 237, 1121
- SOMMER G., SCHILFARTH H. (1975)
Mschr. Brauerei, 28, 5-10
- SOOD V.C., HELDMAN D.R. (1974)
J. Food Sci., 39, 1011-1013
- STEINER K. (1968)
Schweiz. Brau-Runds, 245-249
- TAEUFEL K., VOIGT J. (1964)
Nahrung, 8, 80
- TAKEO T. (1965)
Agr. Biol. Chem., 29, 558-63
- TAN T., WOLFROM M.L., LANGER A.W., (1950)
J. Am. Chem. Soc., 72, 5090-5091
- TILLMANS J., HIRSCH P., REINSHAGEN E. (1928)
Z. Untersch.-Lebensm., 63, 1-21
- TRAITTEUR H. (1951)
Brauwissenschaft, 9, 153-158
- TRESSL R., KOSSA T., RENNER R. (1974)
Mschr. Brauerei, 27, 98-102
- UNDERWOOD J.C., LENTO H.G., WILLITS C.O. (1959)
Food Res., 24, 181-184

- VELISEK J., DAVIDEK J. (1974)
Z. Lebensm. Unters.-Forsch., 154, 157-159
- VOLGINOV G.P., POKHNO M.T. (1950)
Biokhimiya, 15, 67
Chem. Abstracts, 1950, 44, 1950
- WAGNER B. (1971)
Mtschr. Brauerei, 24, 285-287
- WALKER J.R.L., HULME A.C. (1966)
Phytochemistry, 5, 259-262
- WALLERSTEIN J.S., HALE M.G., ALBA R.T. (1947)
Wallerstein Lab. Commun, 10, n° 31, 209-217
- WALLERSTEIN J.S., HALE M.G., ALBA R.T. (1948)
Wallerstein Lab. Commun, 11, n° 32, 105-117
- WALLERSTEIN J.S., HALE M.G., ALBA R.T., LEVY H.B. (1954)
Enzymologia, 16, n° 6, 343-350
- WEBB B.H. (1935)
J. Dairy Sci., 18, 81
- WOLFROM M.L., KASHIMURA N., HORTON D. (1974)
J. Agr. Food Chem., 22, 791-795
- YAMAGUCHI N., FUJIMAKI M. (1973)
J. Food Sci. Technol. (Tokyo), 20, 507-512
- YAMAGUCHI N., KOYAMA Y. (1967)
J. Food Sci. Technol. (Tokyo), 14, 106-110
- YAMAGUCHI N., YOKOO Y., KOYAMA Y. (1964)
J. Food Sci. Technol. (Tokyo), 11, 184
- YOSHIDA T. (1969)
Kirin Kiyo, 20, 127
- YOSHIDA T. (1971)
Rep. Res. Lab. Kirin Brewery Co., Ltd, 14, 37-45
- YOSHIDA T., HATTAN M., MORIMOTO K. (1968)
Rep. Res. Lab. Kirin Brewery Co. Ltd., 11, 63-75
- YOSHIDA T., HORIE Y., KUROIWA Y. (1972)
Inst. Brew. Austr. New Zealand Section, Proc. 12 th Conv. PERTH (W. Australia) 135-146

